

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-523018

(P2020-523018A)

(43) 公表日 令和2年8月6日(2020.8.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/10 1 0 0 Z	4 B 0 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 K	4 B 0 6 5
<b>G O 1 N 33/574 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/574 Z	4 C 0 8 4
<b>C 1 2 N 15/12 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/12 Z N A	4 C 0 8 5
<b>C O 7 K 14/725 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/725	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-568202 (P2019-568202)  
 (86) (22) 出願日 平成30年5月4日 (2018.5.4)  
 (85) 翻訳文提出日 令和2年1月29日 (2020.1.29)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/031197  
 (87) 国際公開番号 W02018/226336  
 (87) 国際公開日 平成30年12月13日 (2018.12.13)  
 (31) 優先権主張番号 62/517, 612  
 (32) 優先日 平成29年6月9日 (2017.6.9)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 515110144  
 プロビデンス ヘルス アンド サービス  
 ーズーオレゴン  
 アメリカ合衆国 オレゴン ポートランド  
 5 F 4 0 ノースイースト グリサン  
 ストリート 4 8 0 5  
 (71) 出願人 519434385  
 アゴノックス, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 オレゴン 9 7 2 1 3,  
 ポートランド, エヌイー グリサン  
 ストリート 4 8 0 5, 2 エヌ 3 5  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんの処置のための腫瘍反応性ヒト T 細胞の同定のための CD 3 9 および CD 1 0 3 の使用

(57) 【要約】

腫瘍を有する対象を処置するための方法が開示される。これらの方法は、対象に治療有効量の CD 8 + CD 3 9 + CD 1 0 3 + T 細胞を投与するステップを含む。腫瘍細胞抗原に特異的に結合する T 細胞受容体 ( T C R ) をコードする核酸を単離するための方法も開示される。これらの方法は、腫瘍細胞抗原を発現する腫瘍を有する対象由来の試料から、CD 8 + CD 3 9 + CD 1 0 3 + T 細胞を単離するステップと、CD 8 + CD 3 9 + CD 1 0 3 + T 細胞から、T C R をコードする核酸分子をクローニングするステップとを含む。さらに、CD 8 + CD 3 9 + CD 1 0 3 + T 細胞を増やすための方法が開示される。追加的な実施形態では、腫瘍を有する対象がチェックポイント阻害剤に応答するかどうかを決定するための方法が開示される。方法は、対象由来の生体試料中の CD 8 + CD 3 9 + CD 1 0 3 + T 細胞の存在を検出するステップを含む。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

腫瘍細胞抗原に特異的に結合する T 細胞受容体 ( T C R ) をコードする核酸を単離する方法であって、

前記腫瘍細胞抗原を発現する腫瘍を有する対象由来の試料から、 C D 3 9 + C D 1 0 3 + C D 8 + T 細胞を単離するステップと、

前記 C D 8 + C D 3 9 + C D 1 0 3 + T 細胞から、 T C R をコードする核酸分子をクローニングするステップと

を含み、それにより、前記 T C R をコードする核酸分子を単離する、方法。

## 【請求項 2】

前記腫瘍が、頭頸部扁平上皮細胞癌、肺がん、黒色腫、卵巣がん、腎細胞癌、膀胱がん、子宮頸がん、肝がん、前立腺がん、乳がん、神経膠芽腫または直腸がんである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記試料が、末梢血または腫瘍生検材料である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記 T 細胞受容体をクローニングする前に、前記 C D 8 + C D 3 9 + C D 1 0 3 + T 細胞を *in vitro* で増やすステップ

をさらに含む、請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記対象がヒトである、請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 に記載の方法によって作製される、 T C R をコードする核酸分子。

## 【請求項 7】

請求項 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法によって作製される T C R をコードする核酸分子によってコードされる T C R 。

## 【請求項 8】

請求項 6 に記載の核酸分子がトランスフェクトされた、単離された宿主 T 細胞。

## 【請求項 9】

前記 T C R が、前記対象にとって自己である、請求項 8 に記載の宿主 T 細胞。

## 【請求項 10】

前記 T C R が、前記対象にとって同種である、請求項 8 に記載の単離された宿主 T 細胞。

## 【請求項 11】

腫瘍を有する対象を処置する方法であって、前記対象に治療有効量の C D 8 + C D 3 9 + C D 1 0 3 + T 細胞を投与するステップを含み、それにより、前記腫瘍を有する前記対象を処置する、方法。

## 【請求項 12】

治療有効量のプログラム死 ( P D ) - 1 アンタゴニスト、プログラム死リガンド ( P D - L 1 ) アンタゴニスト、細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 ( C T L A - 4 ) アンタゴニスト、B リンパ球および T リンパ球アテニューエーター ( B T L A ) アンタゴニスト、T 細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン含有 - 3 ( T I M - 3 ) アンタゴニスト、リンパ球活性化遺伝子 3 ( L A G 3 ) アンタゴニスト、または 4 - 1 B B アンタゴニストを前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

a ) 前記 P D - 1 アンタゴニストが、P D - 1 に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片であり； b ) 前記 P D - L 1 アンタゴニストが、P D - L 1 に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片であり； c ) 前記 C T L A - 4 アンタゴニストが、C T L A - 4 に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片であり； d ) 前記 B T L A アンタゴニストが、B T L A に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片であり； e

10

20

30

40

50

) 前記 T I M - 3 アンタゴニストが、T I M - 3 に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片であり； e ) 前記 L A G 3 アンタゴニストが、L A G 3 に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

P D - 1 に特異的に結合する前記抗体、P D - L 1 に特異的に結合する前記抗体、C T L A - 4 に特異的に結合する前記抗体、B T L A に特異的に結合する前記抗体、T I M - 3 に特異的に結合する前記抗体または L A G 3 に特異的に結合する前記抗体が、ヒトモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 P D - 1 アンタゴニスト、前記 P D - L 1 アンタゴニスト、前記 C T L A - 4 アンタゴニスト、前記 B T L A アンタゴニスト、前記 T I M - 3 アンタゴニスト、または前記 L A G 3 アンタゴニストが、低分子阻害 R N A、アンチセンス R N A、リボザイム、小分子またはドミナントネガティブタンパク質である、請求項 1 2 に記載の方法。

10

【請求項 1 6】

前記腫瘍が、固形腫瘍である、請求項 1 1 から 1 5 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記固形腫瘍が、頭頸部扁平上皮細胞癌、肺がん、黒色腫、卵巣がん、腎細胞癌、膀胱がん、子宮頸がん、肝がん、前立腺がん、乳がん、神経膠芽腫または直腸がんである、請求項 1 6 に記載の方法。

20

【請求項 1 8】

前記 C D 8 + C D 3 9 + C D 1 0 3 + T 細胞が、自己である、請求項 1 1 から 1 7 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記対象における前記腫瘍を切除するステップをさらに含む、請求項 1 1 から 1 7 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記対象がヒトである、請求項 1 1 から 1 9 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

C D 8 + C D 3 9 + C D 1 0 3 + T 細胞を増やす方法であって、  
 C D 8 + C D 3 9 + C D 1 0 3 + T 細胞を、グルタミン、血清、および抗生物質を含む組織培養培地中で培養して、初代培養物を形成するステップと、  
 前記初代培養物を、有効量の照射された同種フィーダー細胞およびインターロイキン ( I L ) - 1 5 で刺激して、刺激された T 細胞を形成するステップと、  
 前記刺激された T 細胞を、組織培養培地および有効量の I L - 1 5 中で培養するステップと  
 を含み、それにより、前記 C D 8 + C D 3 9 + C D 1 0 3 + T 細胞を増やす、方法。

30

【請求項 2 2】

前記初代培養物を、約 5 n g / m l ~ 約 5 0 n g / m l の I L - 1 5 中で刺激するステップ、および / または前記 T 細胞のクラスターを、約 5 n g / m l ~ 約 5 0 n g / m l の I L - 1 5 中で培養するステップを含む、請求項 2 1 に記載の方法。

40

【請求項 2 3】

前記初代培養物を、約 1 0 n g / m l の I L - 1 5 中で刺激するステップ、および / または前記 T 細胞のクラスターを、約 1 0 n g / m l の I L - 1 5 中で培養するステップを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記初代培養物を、有効量の照射された同種フィーダー細胞で刺激するステップが、約 1 , 0 0 0 ~ 約 2 , 0 0 0 個の C D 8 + C D 3 9 + C D 1 0 3 + T 細胞を、約 1 0 0 , 0 0 0 ~ 約 3 0 0 , 0 0 0 個の同種フィーダー細胞で刺激することを含む、請求項 2 1 から 2 3 までのいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 2 5】

約 1,000 ~ 約 2,000 個の CD39 + CD103 + CD8 + 細胞を、約 200,000 個の同種フィーダー細胞で刺激する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

腫瘍を有する対象がチェックポイント阻害剤または放射線に応答するかどうかを決定する方法であって、

前記対象由来の生体試料中の CD8 + CD39 + CD103 + T 細胞の存在を検出するステップ

を含み、

前記生体試料中の前記 CD8 + CD39 + CD103 + T 細胞の存在が、前記チェックポイント阻害剤または放射線が前記対象における前記腫瘍の処置に有効であることを示す、方法。

10

【請求項 27】

前記チェックポイント阻害剤または放射線を前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

腫瘍を有する対象ががん治療剤に応答するかどうかを決定するための方法であって、

前記対象に前記がん治療剤の第 1 の用量を投与するステップと、

前記対象由来の生体試料中の CD8 + CD39 + CD103 + T 細胞の数を決定するステップ

を含み、

前記生体試料中の CD8 + CD39 + CD103 + T 細胞の数が対照と比較して増加することは、前記がん治療剤の前記第 1 の用量が前記対象における前記腫瘍の処置に有効であることを示す、方法。

20

【請求項 29】

腫瘍を有する対象を処置するための方法であって、

対象にがん治療剤の第 1 の用量を投与するステップと、

前記対象由来の生体試料中の CD8 + CD39 + CD103 + T 細胞の数を決定するステップであって、

前記生体試料中の CD8 + CD39 + CD103 + T 細胞の量が対照と比較して増加することは、前記がん治療剤の前記第 1 の用量が前記対象における前記腫瘍の処置に有効であることを示す、ステップと、

30

前記がん治療剤の第 2 の用量を投与するステップであって、前記第 1 の用量が前記第 2 の用量と同じである、または前記第 2 の用量が前記第 1 の用量よりも低い、ステップとを含む方法。

【請求項 30】

腫瘍を有する対象を処置するための方法であって、

前記対象にがん治療剤の第 1 の用量を投与するステップと、

前記対象由来の生体試料中の CD8 + CD39 + CD103 + T 細胞の数を決定するステップであって、

前記生体試料中の CD8 + CD39 + CD103 + T 細胞の量が対照と比較して減少することまたは変化がないことは、前記がん治療剤の前記第 1 の用量が前記対象における前記腫瘍の処置に有効でないことを示す、ステップと、

40

前記がん治療剤の第 2 の用量を投与するステップであって、前記第 2 の用量が前記第 1 の用量よりも高い、または前記第 2 の用量が前記第 1 の用量と同じである、ステップとを含む方法。

【請求項 31】

前記対照が、前記対象から前記がん治療剤を用いた処置の前に得た生体試料中の CD8 + CD39 + CD103 + T 細胞の数であるか、または前記対照が、標準値である、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【請求項 32】

50

前記がん治療剤が、チェックポイント阻害剤である、請求項 27 から 31 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記がん治療剤が、化学療法剤である、請求項 27 から 32 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記チェックポイント阻害剤が、前記対象に対するプログラム死 (PD) - 1 アンタゴニスト、プログラム死リガンド (PD-L) 1 アンタゴニスト、細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (CTLA-4) アンタゴニスト、B リンパ球および T リンパ球アテニューエーター (BTLA) アンタゴニスト、T 細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン含有 - 3 (TIM-3) アンタゴニスト、リンパ球活性化遺伝子 3 (LAG3) アンタゴニスト、または 4-1BB アンタゴニストである、請求項 28 または請求項 33 に記載の方法。

10

【請求項 35】

前記試料が、末梢血試料または腫瘍生検材料である、請求項 27 から 34 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記対象が、ヒトである、請求項 37 から 35 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記腫瘍が、固形腫瘍である、請求項 27 から 36 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記固形腫瘍が、頭頸部扁平上皮細胞癌、肺がん、黒色腫、卵巣がん、腎細胞癌、膀胱がん、子宮頸がん、肝がん、前立腺がん、乳がん、神経膠芽腫または直腸がんである、請求項 37 に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年6月9日に出願された米国仮出願第 62/517,612 号の便益を主張し、この仮出願は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、がんの分野、具体的には、腫瘍を処置するための、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T 細胞などの細胞の養子移入の使用、および CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T 細胞に由来するものなどの T 細胞受容体 (TCR) の使用に関し、また、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T 細胞を測定することによってなどで、処置を評価するための方法に関する。

30

【背景技術】

【0003】

腫瘍細胞を認識し、死滅させることにおいては免疫系が主要な役割を果たし、新しい治療手法は、がん患者におけるその機能をブーストし、かつ/または回復させることに焦点が当てられてきた。有効な免疫応答は、がん細胞を特異的に認識し、細胞傷害性分子およびサイトカインを放出することによって死滅させることができる重要なプレーヤーが CD8<sup>+</sup>T 細胞であるいくつかの異なる細胞型の協調作用を伴う (Klebanoff CA et al., 211:214-24, Immunol. Rev., 2006)。腫瘍浸潤性 CD8<sup>+</sup>T 細胞は、腫瘍性病変において過剰発現される自己抗原、ならびに腫瘍特異的抗原 (TSA) または腫瘍に特異的な変異の結果として生じる新抗原を含み得る腫瘍関連抗原 (TAA) を認識する (Finn OJ, Cancer Immunol Res, 2017)。現行のパラダイムによると、腫瘍特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞は、腫瘍流入領域リンパ節において初回抗原刺激を受け、次いで、血液を介して腫瘍に移動して、それらのエフェクター機能を発揮する。以前の研究により、腫瘍浸潤性 CD8<sup>+</sup>T 細胞が腫瘍特異的 T 細胞ならびに腫瘍特異性を有さないバイスタンダー T 細胞で構成される不均質な細胞の集団であることが示されている。後者は、腫瘍増悪 (増殖、血

40

50

管新生および転移)に関連する炎症によって腫瘍部位に動員される。しかし、養子移入の有効性/効率が増大した免疫療法が未だに必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Klebanoff CA et al., 211:214-24, Immunol. Rev., 2006

【非特許文献2】Finn OJ, Cancer Immunol Res, 2017

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

腫瘍反応性CD8<sup>+</sup>T細胞の表現型および機能を評価し、CD103およびCD39の共発現により、腫瘍微小環境において特異的に誘導される腫瘍浸潤性CD8<sup>+</sup>T細胞の集団が同定されることが確認された。腫瘍内で慢性的に刺激されているこれらの細胞は、腫瘍反応性が高度に富化されており、自己腫瘍細胞を死滅させる能力を有した。ヒト腫瘍におけるCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の頻度が高いことが、全生存期間の延長と相関した。CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の存在は、治療法が腫瘍の処置に有効であることを示し得ることが決定された。さらに、腫瘍を処置するためにCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を対象に養子移入することができる。

【0006】

腫瘍を有する対象を処置するための方法であって、対象に治療有効量のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を投与するステップを含み、それにより、腫瘍を有する対象を処置する、方法が開示される。一部の実施形態では、方法は、治療有効量のプログラム死(PD)-1アンタゴニスト、プログラム死リガンド(PD-L)1アンタゴニスト、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4)アンタゴニスト、Bリンパ球およびTリンパ球アテニューエーター(BTLA)アンタゴニスト、T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン含有-3(TIM-3)アンタゴニスト、リンパ球活性化遺伝子3(LAG3)アンタゴニスト、または4-1BBアンタゴニストを対象に投与するステップを含む。

【0007】

一部の実施形態では、腫瘍細胞抗原に特異的に結合するT細胞受容体(TCR)をコードする核酸配列を単離するための方法が開示される。これらの方法は、腫瘍細胞抗原を発現する腫瘍を有する対象からCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を単離するステップと、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞から、TCR分子をコードする核酸配列をクローニングして、それにより、腫瘍に特異的なTCRをコードする核酸配列を単離するステップとを含む。

【0008】

追加的な実施形態では、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を増やすための方法が開示される。これらの方法は、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を、グルタミン、血清、および抗生物質を含む組織培養培地中で培養するステップと、単離されたT細胞を有効量の照射された同種フィーダー細胞およびサイトカインで刺激するステップと、刺激されたT細胞を、組織培養培地および有効量のサイトカイン中で培養するステップとを含む。

【0009】

さらに他の実施形態では、腫瘍を有する対象が、チェックポイント阻害剤、生物学的反応修飾物質(例えば、サイトカインおよびケモカイン)、がんワクチン、化学療法および/または放射線などのがん治療剤(a cancer therapeutic)に应答するかどうかを決定するための方法が開示される。対象が外科処置に应答するかどうかを決定するための方法も開示される。方法は、対象由来の生体試料中のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の存在を検出するステップを含み、生体試料中のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の存在は、がん治療剤または外科処置が対象における腫瘍の処置に有効であることを示す。一部の非限定的な実施例では、方法は、がん治療剤を対象に投与する、または外科処置

10

20

30

40

50

を実施するステップも含み得る。

【0010】

さらなる実施形態では、腫瘍を有する対象ががん治療剤に応答するかどうかを決定するための方法が開示される。方法は、対象に第1の用量のがん治療剤を投与するステップと、対象由来の生体試料中のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の数を決定するステップとを含む。生体試料中のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の数が対照と比較して増加することは、第1の用量のがん治療剤が対象における腫瘍の処置に有効であることを示す。

【0011】

さらなる実施形態では、腫瘍を有する対象を処置するための方法が開示される。方法は、対象に第1の用量のがん治療剤を投与するステップと、対象由来の生体試料中のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の数を決定するステップとを含む。生体試料中のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の量が対照と比較して増加することは、第1の用量のがん治療剤が対象における腫瘍の処置に有効であることを示す。第2の用量のがん治療剤を対象に投与し、ここで、第1の用量は第2の用量と同じである、または、第2の用量は第1の用量よりも低い。

10

【0012】

他の実施形態では、腫瘍を有する対象を処置するための方法が開示される。方法は、対象に第1の用量のがん治療剤を投与するステップと、対象由来の生体試料中のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の数を決定するステップとを含む。生体試料中のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の量が対照と比較して減少することまたは変化がないことは、第1の用量のがん治療剤が対象における腫瘍の処置に有効でないことを示す。第2の用量のがん治療剤を対象に投与し、ここで、第2の用量は第1の用量よりも高い、または、第2の用量は、第1の用量と同じである。

20

【0013】

前述のおよび他の本発明の目的、特徴、および利点は、添付図を参照して進める以下の詳細な説明からより明白になる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1A】図1A～1F。腫瘍浸潤性CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞はエクトヌクレオチダーゼCD39を共発現する。(A)頭頸部扁平上皮細胞癌(HNSCC)に浸潤するT細胞のフローサイトメトリー分析についての代表的なゲーティング戦略。プロット内の数字は、それぞれのゲートにおける細胞のパーセントを示す。(B)(A)に示されているCD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞に関してゲーティングした腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)のviSNE分析。ゲートにより、CD39の発現が最も高いCD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞が同定される。ゲートは、PD-1、CD69およびCD127の発現レベルを示す全てのプロットに適用される。(C)HNSCC、黒色腫、卵巣がんおよびCRLMがん患者から単離されたCD8<sup>+</sup>TILのフローサイトメトリー分析。各四分円内の数字は、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞における、CD39および/またはCD103について陽性の細胞のパーセントを示す。(D)異なる固形悪性病変を有する患者の間でのCD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>(DP)CD8<sup>+</sup>TILの頻度の要約。HNSCC患者40名、肺がん患者2名、黒色腫患者6名、卵巣がん患者2名、直腸がん患者3名、結腸がんを有する患者3名およびCRLMを有する患者6名が示されている。赤色の円は、マイクロサテライト不安定性(MSI)をもたらすリンチ症候群を有する結腸患者1名を強調したものである。(E)HNSCC患者1名由来の末梢血、正常LN、原発腫瘍および転移性LNにおけるDP CD8<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージに関するフローサイトメトリー分析。各四分円内の数字は、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞における、CD39および/またはCD103について陽性の細胞のパーセントを示す。データは、分析されたHNSCC患者40名を表す(正常LNおよび転移性LNについては9名の患者のみ)。パーセンテージが(F)に要約されている。

30

40

50

【図1B】同上。

【図1C】同上。

【図1D】同上。

【図1E】同上。

【図1F】同上。

【0015】

【図2AB】図2A~2D。CD8+CD39+CD103+TILの遺伝子発現プロファイリングにより、T<sub>RM</sub>細胞を暗示するプロファイルが明らかになる。(A)HNSCC患者3名および卵巣がん患者2名から単離された、選別されたDN CD8 TIL、SP CD8 TILおよびDP CD8 TILの遺伝子発現に関する主成分分析(PCA)。本分析は、ダブルポジティブ(DP)CD8 TILとダブルネガティブ(DN)CD8 TILの間で差次的に発現される遺伝子(n=372)に対して実施した。(B)DP CD8 TILとDN CD8 TILの間で差次的に発現される遺伝子372種を使用した試料の教師なしクラスタリング。濃い灰色は下方調節される遺伝子を示し、薄い灰色は上方調節される遺伝子を示す。(C)ウォーターフォールプロットは、DPサブセットとDNサブセットとにおける、最も上方調節される遺伝子および下方調節される遺伝子の倍率変化(log2)を表す。薄い灰色により、慢性活性化シグネチャーを有する遺伝子が識別される；濃い灰色は、T<sub>RM</sub>表現型に関連する遺伝子を示す。(D)分析された患者5名のそれぞれにおける上位の差次的に発現される遺伝子の発現。上の列はT<sub>RM</sub>表現型に関連する遺伝子を示し、下の列は慢性活性化シグネチャー遺伝子を示す。各符号は患者を表し、それらが線でつながっている。

10

20

【図2C】同上。

【図2D】同上。

【0016】

【図3A】図3A~3E。DP CD8 TIL、SP CD8 TILおよびDN CD8 TILの表現型および機能的性質。(A)CD8 TILにおけるT<sub>RM</sub>表現型を描写する、表面タンパク質CD69、CCR7、CD127およびCD28の発現のex vivo表現型分析(上)。数名のがん患者の間での上記のマーカーの頻度の要約(n=6~13、下)。\*p<0.05；\*\*\*p<0.001；\*\*\*\*p<0.0001(ANOVA)。(B)CD8 TILにおける活性化された/慢性的に刺激される表現型を図で表す、表面および細胞内タンパク質PD-1、CTLA-4、TIM-3、4-1BBおよびKi-67の発現に関するex vivo表現型分析(上)。数名のがん患者の間での上記のマーカーの頻度の要約(n=5~17、下)。\*\*\*p<0.001；\*\*\*\*p<0.0001(ANOVA)。(C)PMA/イオノマイシンを用いて4時間にわたって刺激したCD8 TILサブセットによるIFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ 産生に関する代表的なフローサイトメトリー分析。各四分円内の数字は、CD3+CD8+T細胞に関してIFN- $\gamma$ および/またはTNF- $\alpha$ について陽性の細胞のパーセントを示す。(D)CD8 TILサブセットによるIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ ダブルポジティブ細胞の頻度。データは、HNSCC患者6名からのものである。(E)CD8 TILによるグランザイムB産生に関する代表的なフローサイトメトリー分析(左)および6名の異なるHNSCC患者に関する要約(右)。\*p<0.05；\*\*\*\*p<0.0001(ANOVA)。

30

40

【図3B】同上。

【図3CD】同上。

【図3E】同上。

【0017】

【図4】図4。CD8 T細胞におけるCD39およびCD103の発現にはTGF- $\beta$ が豊富な環境での持続的な刺激が必要である。末梢血由来の選別されたナイーブCD8 T細胞におけるCD39、CD103およびPD-1発現のカイネティクス。細胞を、TGF- $\beta$  (2 ng/ml)の存在下または非存在下で、CD3/CD28でコーティング

50

されたビーズをビーズ：T細胞比1：2で用いて刺激し、示されている時点でCD39、CD103およびPD-1の発現をフローサイトメトリーによって分析した。データは、4回の独立した実験を表す。

【0018】

【図5A】図5A～5D。DP CD8 TILは高度にクローン性であり、他のいずれのCD8 T細胞サブセットともほとんど重複しない。(A)血中メモリーCD8 T細胞、DN CD8 TIL、SP CD8 TILおよびDP CD8 TIL内のTCRレパートリーの多様性。HPV+HNSCC患者およびHPV-HNSCC患者および1名の卵巣がん患者について、最も頻度が高いクローン型、2番目から5番目に頻度が高いクローン型、6番目から30番に頻度が高いクローン型、および残りのクローン型の頻度が示されている。(B)500種の最も頻度が高いCD8 TILクローン型がDN CD8 TILサブセット、SP CD8 TILサブセットおよびDP CD8 TILサブセットにおけるそれらの頻度に基づいてプロットされている。各ドットが別個のTCRクローン型を表す。軸上のドットは、単一のレパートリー内で検出されたクローン型を示す。(C)血中および正常LN中のメモリーCD8 T細胞における上位500種のクローン型の頻度とDN CD8 TILサブセットおよびDP CD8 TILサブセットにおける上位500種のクローン型の頻度を比較した、(B)におけるものと同じ分析。(D)Morisita-Horn指数を使用して分析された、DP CD8 TILと、血中メモリーCD8 T細胞、DN CD8 TILおよびSP CD8 TILとの間のTCR配列の重複。TCR配列の重複が1であることは、2つの集団間の類似性が100%であることを示す。

10

20

【図5B】同上。

【図5C】同上。

【図5D】同上。

【0019】

【図6A】図6A～6F。DP CD8 TILは自己腫瘍細胞を認識し、死滅させる、そして、それらの頻度は全生存の改善と相関する。(A)増やしたCD8 TILを、漸増数の自己腫瘍細胞と共に20時間培養し、4-1BB発現の頻度(黒塗りの記号)およびIFN- $\gamma$ 分泌(白抜きの記号)を測定することによって認識を評価することにより、腫瘍反応性について試験した。3名のがん患者についての結果が示されている。(B)自己腫瘍細胞を、MHC-I遮断抗体、同種腫瘍細胞、およびプレートに結合させた抗CD3を伴ってまたは伴わずに培養することにより、DP CD8 TILの反応性を確認した。3名のがん患者についての20時間後の4-1BBの上方調節が示されている。(C)腫瘍細胞殺滅を、20時間の期間にわたって毎時モニタリングしたウェル当たりのカスパーゼ3/7+事象の量を評価することによって測定した。(D)共培養の最初(T=0)および最後(T=20時間)に取得したDN CD8 TILおよびDP CD8 TILについての代表的な画像。(E)外科手術時の総CD8 TILの中でのDP CD8 TILの頻度に基づいたHNSCC患者62名のコホートについての全生存期間。(F)HPV陰性HNSCC患者30名のコホートに対して実施した同様の分析。

30

【図6BC】同上。

40

【図6D】同上。

【図6EF】同上。

【0020】

【図7A】図7A～7C。DP CD8 TILは腫瘍反応性細胞に富み、原発腫瘍TCRレパートリーは同じ個体内の転移性LN TCRレパートリーと重複する。(A)および(B)DP CD8 TILを選別し、*in vitro*で増やした。増やした後、DP CD8 TILを自己腫瘍細胞と共に24時間共培養した。培養の最後に、細胞を4-1BBおよびCD25の発現に基づいて選別した。共培養前のDP CD8 TILのTCRレパートリーを4-1BB+CD25+DP CD8 TIL(腫瘍反応性)のTCRレパートリーと比較した。共培養前のDP CD8 TILにおける上位15種のク

50

ローン型が、腫瘍細胞との共培養の前後のそれらそれぞれの頻度と共に示されている。2名のがん患者からの結果が示されている。(C)500種の最も頻度が高いDP CD8 TILクローン型が原発腫瘍および転移性LNにおけるそれらの頻度に基づいてプロットされている。2名のHNSCC患者からの結果が示されている。図7Aに、配列番号1~15が上(配列番号1)から下(配列番号15)までの順で示されている。図7Bに、配列番号16~30が上(配列番号16)から下(配列番号30)までの順で示されている。

【図7B】同上。

【図7C】同上。

【発明を実施するための形態】

10

【0021】

配列表

添付の配列表に列挙されている核酸配列およびアミノ酸配列は、37C.F.R.1.822において定義されている通り、ヌクレオチド塩基については標準の文字略語、およびアミノ酸については3文字コードを使用して示されている。各核酸配列の一方の鎖のみが示されているが、示されている鎖への言及のいずれにも相補鎖が含まれると理解されたい。配列表は、ASCIIテキストファイル[Sequence\_Listing、2018年5月4日、7,113バイト]として提出され、参照により本明細書に組み込まれる。添付の配列表中：

配列番号1~30は、例示的なTCRB CDR3領域のヌクレオチド配列である。

20

詳細な説明

【0022】

がん患者に対する免疫療法および養子T細胞移入の有効性を改善する必要性、ならびに、特定の亜集団を診断方法に使用するために、抗腫瘍応答に関与するCD8 T細胞を特徴付ける必要性がある。CD39<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞は、CD39+CD103+CD8<sup>+</sup>T細胞およびCD39+CD103-CD8<sup>+</sup>T細胞を含む。腫瘍反応性CD8 T細胞の表現型および機能が決定されたことが本明細書に開示され、また、CD103およびCD39の共発現により、腫瘍微小環境において特異的に誘導される独特の腫瘍浸潤性CD8 T細胞の集団が同定されることが実証された。腫瘍内で慢性的に刺激されているこれらの細胞は、腫瘍反応性が高度に富化されており、自己腫瘍細胞を死滅させる能力を有する。ヒト腫瘍におけるCD103+CD39+CD8 T細胞の頻度が高いことが、全生存期間の延長と相関し、これにより、生体試料中のこれらの細胞の評価により、処置の有効性を決定するため、および腫瘍を有する対象が処置に応答するかどうかを評価するための方法がもたらされることが示される。

30

用語

【0023】

特に断りのない限り、技術用語は、従来の使用に従って使用されている。分子生物学における一般用語の定義は、Benjamin Lewin, Genes V, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); およびRobert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)において見出すことができる。

40

【0024】

本開示の種々の実施形態についての再調査を容易にするために、以下の特定の用語の説明を提示する：

【0025】

4-1BB: CD137およびTNFRSF9とも称される膜貫通タンパク質であり、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFRS)のタンパク質である。4-1BBの発現は、一般に、活性化依存的であり、活性化されたNK細胞およびNKT細胞、調節

50

性T細胞、活性化されたCD4 T細胞およびCD8 T細胞、樹状細胞(DC)、刺激された肥満細胞、分化している骨髄細胞、単球、好中球、ならびに好酸球を含めた、免疫細胞の広範なサブセットに存在する(Wang, 2009, Immunological Reviews 229: 192-215)。4-1BB発現は、腫瘍脈管構造(Broll, 2001, Amer. J. Clin. Pathol. 115(4):543-549; Seaman, 2007, Cancer Cell 11: 539-554)および炎症部位またはアテローム硬化性内皮(Drenkard, 2007 FASEB J. 21: 456-463; Olofsson, 2008, Circulation 117: 1292-1301)においても実証されている。4-1BBを刺激するリガンド、すなわち、4-1BBリガンド(4-1BBL)は、活性化された抗原提示細胞(APC)、骨髄系前駆細胞、および造血幹細胞において発現される。ヒト4-1BBは、255アミノ酸のタンパク質である(2017年6月1日に利用可能な参照により本明細書に組み込まれるGENBANK受託番号NM\_001561およびNP\_001552を参照されたい)。4-1BBのアゴニスト抗体は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,337,850号において開示されている。

10

## 【0026】

レベルの変更：特定の細胞型の細胞の数、または核酸配列もしくはアミノ酸配列(例えば、ポリペプチド、siRNA、miRNA、mRNA、遺伝子)の産生もしくは発現のレベルの、対照レベルと比較した増加または低下のいずれかによる変化。

## 【0027】

アンチセンス、センス、およびアンチジーン：DNAは、プラス鎖と称される5' 3'鎖およびマイナス鎖と称される3' 5'鎖の2本の逆平行鎖を有する。RNAポリメラーゼにより核酸が5' 3'方向に付加されるので、DNAのマイナス鎖は、転写の間のRNAの鋳型としての機能を果たす。したがって、RNA転写物は、マイナス鎖と相補的な配列、およびプラス鎖と同一の配列(TがUに置換される以外)を有する。

20

## 【0028】

アンチセンス分子は、RNAまたはDNAのプラス鎖のいずれかに特異的にハイブリダイズ可能または特異的に相補的な分子である。センス分子は、DNAのマイナス鎖に特異的にハイブリダイズ可能または特異的に相補的な分子である。アンチジーン分子は、DNA標的に向けられたアンチセンス分子またはセンス分子のいずれかである。アンチセンスRNA(asRNA)は、センス(コード)核酸分子と相補的なRNAの分子である。

30

## 【0029】

抗体：PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3または4-1BBポリペプチド、またはその断片などの抗原のエピトープを認識し、それに結合する(例えば、特異的に認識し、特異的に結合する)少なくとも軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドリガンド。免疫グロブリン分子は、重鎖および軽鎖で構成され、そのそれぞれが、可変重鎖(V<sub>H</sub>)領域および可変軽鎖(V<sub>L</sub>)領域と称される可変領域を有する。V<sub>H</sub>領域およびV<sub>L</sub>領域は、一緒になって、抗体によって認識される抗原との結合に参与する。

## 【0030】

抗体は、インタクトな免疫グロブリン、ならびに当技術分野で周知の抗体のバリエーションおよび一部、例えば、単ドメイン抗体(例えば、VHドメイン抗体)、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'<sub>2</sub>断片、単鎖Fvタンパク質(「scFv」)、およびジスルフィド安定化Fvタンパク質(「dsFv」)などを含む。scFvタンパク質は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域と免疫グロブリンの重鎖可変領域がリンカーによって結合した融合タンパク質であり、一方、dsFvは、鎖の会合を安定化させるためにジスルフィド結合が導入されるように鎖を変異させたものである。この用語は、キメラ抗体(例えば、ヒト化マウス抗体)、ヘテロコンジュゲート抗体(例えば、二重特異性抗体)などの、遺伝子操作された形態も包含する。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3<sup>rd</sup> Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997も参照されたい。

40

## 【0031】

50

一般には、天然に存在する免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によって相互接続した重（H）鎖と軽（L）鎖を有する。軽鎖には2つの型、ラムダ（ $\lambda$ ）およびカッパ（ $\kappa$ ）がある。抗体分子の機能活性を決定する主要な重鎖クラス（またはアイソタイプ）が5種存在する：I g M、I g D、I g G、I g AおよびI g E。

#### 【0032】

重鎖および軽鎖それぞれが、定常領域および可変領域を含有する（領域は、「ドメイン」としても公知である）。重鎖可変領域および軽鎖可変領域は組み合わさって抗原に特異的に結合する。軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」とも称される超可変領域が3つ間に入った「フレームワーク」領域を含有する。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、Kabatら（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991を参照されたい）およびImMunoGeneTicsデータベース（IMGT）（Lefranc, Nucleic Acids Res 29:207-9, 2001；およびimgt.cines.fr/IMGT\_vquest/vquest?\_livret=0&Option=humanIlgを参照されたい）に従って定義されている。Kabatデータベースはオンライン（ncbi.nlm.nih.gov/igblast/）で維持されている。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、ヒトなどの種内では比較的保存されている。構成物である軽鎖および重鎖のフレームワーク領域の組合せである抗体のフレームワーク領域は、CDRを3次元空間に位置付け、整列させる働きをする。

10

#### 【0033】

CDRは、抗原のエピトープへの結合に主に関与する。各鎖のCDRは、一般には、N末端から開始して逐次的に番号を付し、CDR1、CDR2、およびCDR3と称され、また、一般には、特定のCDRが位置する鎖によっても識別される。したがって、 $V_H$  CDR3（またはH-CDR3）はそれが見いだされる抗体の重鎖の可変ドメインに位置し、 $V_L$  CDR1（またはL-CDR1）は、それが見いだされる抗体の軽鎖の可変ドメイン由来のCDR1である。PD-1、PD-L1、またはPD-L2に結合する抗体は、例えば、特異的な $V_H$ 領域配列および $V_L$ 領域配列、したがって、特異的なCDR配列を有する。異なる特異性（すなわち、異なる抗原に対する異なる結合部位（combining site））を有する抗体は、異なるCDRを有する。CDRは抗体によって変動するが、抗原との結合に直接関与するのはCDR内の限られた数のアミノ酸位のみである。CDR内のこれらの位置は、特異性決定残基（SDR）と称される。

20

30

#### 【0034】

「 $V_H$ 」または「 $VH$ 」への言及は、Fv、scFv、dsFvまたはFabの可変領域を含めた、免疫グロブリン重鎖の可変領域を指す。「 $V_L$ 」または「 $VL$ 」への言及は、Fv、scFv、dsFvまたはFabの可変領域を含めた、免疫グロブリン軽鎖の可変領域を指す。

#### 【0035】

「モノクローナル抗体」は、Bリンパ球の単一のクローンによって、または単一の抗体の軽鎖および/もしくは重鎖遺伝子がトランスフェクトされた細胞によって産生される抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法によって、例えば、骨髄腫細胞と免疫脾臓細胞の融合物からハイブリッド抗体形成細胞を作製することによって産生される。モノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体を含む。

40

#### 【0036】

「キメラ抗体」は、ヒトなどの1つの種に由来するフレームワーク残基と、PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3または4-1BBポリペプチドに特異的に結合するマウス抗体などの別の種に由来するCDR（一般に、抗原結合性を付与する）とを有する。

#### 【0037】

「ヒト」抗体（「完全ヒト」抗体とも称される）は、ヒトフレームワーク領域およびヒト免疫グロブリンに由来するCDRの全てを含む抗体である。一実施例では、フレームワークおよびCDRは、同じ起源のヒト重鎖および/または軽鎖アミノ酸配列に由来する。

50

しかし、1つのヒト抗体に由来するフレームワークを、異なるヒト抗体に由来するCDRを含むように工学的に操作することができる。「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域と、非ヒト（例えば、マウス、ラット、または合成）免疫グロブリン由来の1つまたは複数のCDRとを含む免疫グロブリンである。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と称され、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と称される。一実施形態では、ヒト化免疫グロブリンにおけるCDR全てがドナー免疫グロブリンに由来する。定常領域は存在する必要はないが、存在する場合には、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85～90%、例えば約95%またはそれよりも大きく同一でなければならない。したがって、ヒト化免疫グロブリンの部分は全て、恐らくCDR以外は、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。ヒト化抗体は、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリンまたは抗体のアクセプターフレームワークは、ドナーフレームワークから取得されたアミノ酸による限られた数の置換を有し得る。ヒト化または他のモノクローナル抗体は、抗原との結合や他の免疫グロブリン機能に実質的に影響を及ぼさない追加的な保存的アミノ酸置換を有し得る。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子工学によって構築することができる（例えば、米国特許第5,585,089号を参照されたい）。

10

#### 【0038】

抗原：動物に注射されるまたは吸収される組成物を含めた、動物における抗体の産生またはT細胞応答を刺激することができる化合物、組成物、または物質。抗原は、異種免疫原によって誘導されるものを含めた特異的な体液性免疫または細胞性免疫の産物と反応する。「抗原」という用語は、関連する抗原エピトープ全てを含む。「エピトープ」または「抗原決定基」は、B細胞および/またはT細胞が応答する抗原上の部位を指す。一実施形態では、T細胞は、エピトープがMHC分子と併せて提示された場合にエピトープに反応する。エピトープは、連続したアミノ酸で形成される場合もあり、タンパク質の三次折り畳みによって並置する連続していないアミノ酸で形成される場合もある。連続したアミノ酸で形成されるエピトープは、一般には変性溶媒に曝露しても保持されるが、一方、三次折り畳みによって形成されるエピトープは、一般には変性溶媒で処理すると失われる。エピトープは、一般には、少なくとも3アミノ酸、より通常には少なくとも5アミノ酸、約9アミノ酸、または約8～10アミノ酸を独特の空間コンフォメーションで含む。エピトープの空間コンフォメーションを決定する方法としては、例えば、X線結晶構造解析および2次元核磁気共鳴が挙げられる。

20

30

#### 【0039】

抗原提示細胞（APC）：MHCクラスIまたはクラスII分子と結合した抗原をT細胞に提示することができる細胞。APCとしては、これだけに限定されないが、単球、マクロファージ、樹状細胞、B細胞、T細胞およびランゲルハンス細胞が挙げられる。抗原を他のT細胞（CD4+および/またはCD8+ T細胞を含む）に提示することができるT細胞は抗原提示T細胞（T-APC）である。

#### 【0040】

Bリンパ球およびTリンパ球アテニュエーター（BTLA）：CD272としても公知のタンパク質。BTLA発現はT細胞の活性化の間に誘導され、BTLAは、Th1細胞上に発現したままになる。BTLAは、B7ホモログであるB7H4と相互作用し、腫瘍壊死ファミリー受容体との相互作用を介してT細胞阻害において役割を果たす。BTLAは、ヘルペスウイルス侵入メディエーター（HVEM）としても公知の腫瘍壊死因子（受容体）スーパーファミリー、メンバー14（TNFRSF14）のリガンドである。BTLA-HVEM複合体は、T細胞免疫応答を負に制御する。特定の非限定的なBTLAアミノ酸配列、およびBTLAをコードするmRNA配列は、参照により本明細書に組み込まれるGENBANK（登録商標）受託番号NM\_001085357、2016年9月1日で提供される。BTLAアンタゴニストは、BTLAの発現もしくは活性を低減する

40

50

、または、例えば、BT LAに特異的に結合し、BT LAの腫瘍壊死因子受容体への結合を阻害することによってBT LAのT細胞阻害機能を阻害する作用剤を含む。例示的な化合物としては、抗体（例えば、抗BT LA抗体）、RNA i分子、アンチセンス分子、およびドミナントネガティブタンパク質が挙げられる。

#### 【0041】

結合または安定な結合（オリゴヌクレオチド）：オリゴヌクレオチドは、その結合の検出が可能になるのに十分な量のオリゴヌクレオチドがその標的核酸と塩基対を形成するまたはハイブリダイズする場合、標的核酸に結合するまたは安定に結合する。結合は、標的：オリゴヌクレオチド複合体の物理的性質または機能的性質のいずれかによって検出することができる。標的とオリゴヌクレオチドの結合は、機能的結合アッセイおよび物理的結合アッセイの両方を含めた、当業者に公知の任意の手順によって検出することができる。例えば、結合が、例えば遺伝子の発現、DNA複製、転写、翻訳などの生合成プロセスに対して観察可能な影響を及ぼすかどうかを決定することにより、結合を機能的に検出することができる。

10

#### 【0042】

DNAまたはRNAの相補鎖の結合を検出するための物理的方法は当技術分野で周知であり、それらとして、DNase Iまたは化学的フットプリント、ゲルシフトおよび親和性切断アッセイ、ノーザンプロット法、ドットプロット法および光吸収検出手順などの方法が挙げられる。例えば、単純であり信頼できることから広く使用されている1つの方法は、温度をゆっくりと上昇させてオリゴヌクレオチド（または類似体）および標的核酸を含有する溶液の220～300nmにおける光吸収の変化を観察することを伴う。オリゴヌクレオチドまたは類似体はその標的に結合している場合、特有の温度でオリゴヌクレオチド（または類似体）と標的が互いから解離する、または融解するので吸収が突然増加する。

20

#### 【0043】

オリゴマーとその標的核酸の結合は、オリゴマーの50%がその標的から融解する温度（ $T_m$ ）によってしばしば特徴付けられる。（ $T_m$ ）がより高いことは、複合体が、（ $T_m$ ）がより低い複合体と比べてより強力またはより安定であることを意味する。

#### 【0044】

結合親和性：抗体の抗原に対する親和性。一実施形態では、Frankel et al., Mol. Immunol., 16:101-106, 1979により記載されたスキャッチャード法の改変版によって親和性を算出する。別の実施形態では、抗原/抗体解離速度によって結合親和性を測定する。別の実施形態では、競合ラジオイムノアッセイによって高結合親和性を測定する。別の実施形態では、ELISAによって結合親和性を測定する。抗原（PD-1、PD-L1、CTLA-4、BT LA、TIM-3、LAG3または4-1BBポリペプチドなど）に「特異的に結合する」抗体とは、抗原に高親和性で結合し、他の無関係の抗原には有意には結合しない抗体である。

30

#### 【0045】

がん治療剤：対象におけるがんを処置するために有用な任意の作用剤。がん治療剤としては、チェックポイント阻害剤、生物学的反応修飾物質（例えば、サイトカインおよびケモカイン）、がんワクチン、化学療法および/または放射線が挙げられる。

40

#### 【0046】

化学療法剤：異常な細胞成長を特徴とする疾患の処置において治療有用性がある任意の化学薬剤。そのような疾患としては、腫瘍、新生物、およびがん、ならびに乾癬などの過形成性の成長を特徴とする疾患が挙げられる。一実施形態では、化学療法剤は、放射性化合物である。当業者は、有用な化学療法剤を容易に同定することができる（例えば、Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th edition; Perry et al., Chemotherapy, Ch. 17 in Abeloff, Clinical Oncology 2<sup>nd</sup> ed., (C) 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer, L., Berkery, R. (eds.): Oncology Pocket Guide

50

to Chemotherapy, 2nd ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer, D.S., Knobf, M.F., Durivage, H.J. (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993を参照されたい)。併用化学療法は、がんを処置するために1種よりも多くの作用剤を投与することである。1つの例は、細胞、放射性化合物、または化学化合物と組み合わせて使用される、PD-1、PD-L1、またはCTLA-4ポリペプチドに結合する抗体の投与である。

【0047】

CD39 (ENTPD1) : 2つの膜貫通ドメインと大きな細胞外領域とを有する内在性膜タンパク質 (Maliszewski et al., 1994)。CD39 (ENTPD1) は、ヒトリンパ球上に活性化マーカーとしておよび血管エクト-ADPaseとして最初に同定された (Kaczmarek E et al. (1996) Biol Chem)。 「CD39」という用語は、エクトヌクレオシド三リン酸ジホスホヒドロラーゼ-1 (ENTPD1) とも称されるCD39タンパク質を指す。 *in vivo* におけるCD39は、調節性T細胞 (Treg細胞)、B細胞およびいくつかの自然免疫細胞上で発現される。CD39は、アデノシン三リン酸 (ATP) およびアデノシン二リン酸 (ADP) のアデノシン-リン酸 (AMP) への加水分解によって免疫抑制において重要な役割を果たし、次いでアデノシン-リン酸 (AMP) はエクト-5'-ヌクレオチダーゼであるCD73によってアデノシンにプロセシングされる。アデノシンは、T細胞上のA2A受容体に結合することにより細胞内cAMPの蓄積を増強し、それにより、T細胞活性化を防止する強力な免疫調節因子である (Deaglio S et al., JEM, 2007)。いくつかのヒト固形悪性病変ではCD39およびCD73の両方の発現が増加する (Antonioli Luca et al., Trends Mol Med, 2013)。両方の酵素の上方調節は低酸素環境内において有利であり、それらの逐次的な協調作用は腫瘍免疫エスケープにおいて役割を果たし得る (Eltzschig HK et al., Blood 2009; Ghiringhelli F et al., J Biomed Biotech, 2012)。特定の非限定的なCD39アミノ酸配列およびCD39をコードするmRNA配列は、参照により本明細書に組み込まれるGENBANK (登録商標) 受託番号NM\_001776、2017年5月1日で提供される。

【0048】

CD103 : インテグリンアルファE (ITGA E) として公知であり、CD103は、インテグリンベータ7 (ITGB7) と結合して、ヘテロ二量体インテグリン分子であるE7を形成する。E7の主要なリガンドは、上皮細胞上に見いだされる接着分子であるE-カドヘリンである。これは、腸の部位へのT細胞ホーミングおよび組織内の組織常在性メモリー (T<sub>RM</sub>) 細胞の保持のために重要である。 *in vivo* では、CD103は、消化管内の樹状細胞のサブセットおよび組織常在性メモリー細胞 (T<sub>RM</sub>) として特徴付けられる末梢組織上に存在するT細胞の集団において発現される (Schenkel JM et al., Immunity, 2014; Mueller SN et al., Nat Rev Immunol, 2015)。CD103はまた、高悪性度の漿液性卵巣がん、肺がん、膀胱の尿路上皮細胞癌および子宮内膜癌におけるCD8 T細胞のサブセットにおいても発現される (Webb JR et al., Clin Cancer Res, 2014; Webb JR et al., Cancer Immunol Res, 2015; Komdeur FL et al., Oncotarget, 2016; Djenidi F et al., J Immunol, 2015; Wang B et al., J Urol, 2015; Workel HH et al., EJC, 2015)。これらの悪性病変では、CD103 + CD8 T細胞は腫瘍内に優先的に局在し、したがって、腫瘍細胞との直接相互作用に好都合である。CD103 + CD8 T細胞は、活性化/疲弊表面分子であるPD-1を高レベルで発現し、PD-1は、そのリガンドであるPD-L1と相互作用するとT細胞の増殖、生存およびエフェクター機能の阻害をもたらす (Webb JR et al., Cancer Immunol Res, 2015)。特定の非限定的なCD103アミノ酸配列およびCD103をコードするmRNA配列は、参照により本明細書に組み込まれるGENBANK (登録商標) 受託番号NM\_002208、2017年5月20日で提供される。

【0049】

10

20

30

40

50

保存的バリエーション：「保存的」アミノ酸置換は、抗体などのタンパク質の親和性に実質的に影響を及ぼさず、それを低下させない置換である。例えば、PD-1、PD-L1、BTLA、TIM-3、LAG3、CTLA-4または4-1BBに特異的に結合するヒト抗体は、最大で約1カ所、最大で約2カ所、最大で約5カ所、および最大で約10カ所、または最大で約15カ所の保存的置換を含み、かつ、PD-1、PD-L1、BTLA、TIM-3、LAG3、CTLA-4または4-1BBポリペプチドに特異的に結合することができる。保存的バリエーションという用語は、抗体がPD-1、PD-L1、BTLA、TIM-3、LAG3、CTLA-4または4-1BBポリペプチドに特異的に結合するのであれば、非置換親アミノ酸の代わりに置換アミノ酸を使用することも含む。非保存的置換は、活性またはPD-1、PD-L1、BTLA、TIM-3、LAG3、CTLA-4、もしくは4-1BBポリペプチドへの結合を低減する置換である。

10

## 【0050】

機能的に類似したアミノ酸が提示されている保存的アミノ酸置換表が当業者には周知である。以下の6つの群は、互いに保存的置換であるとみなされるアミノ酸の例である：

- 1) アラニン (A)、セリン (S)、トレオニン (T)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；および
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

20

## 【0051】

接触させること：直接物理的に関連するように置くことであり、固体の形態および液体の形態のどちらも包含する。

## 【0052】

対照レベル (免疫パラメーター)：免疫パラメーターのベースラインレベル。一部の実施形態では、対照レベルは、治療剤の非存在下での、免疫系の成分、例えば特定の型の細胞のレベルである。対照レベルは、目的の作用剤を用いた処置を受けていない対象由来の試料、または対照作用剤を用いた処置を受けた対象由来の試料において測定することができる。対照レベルはまた、経時的に多数の試料の平均から決定される値などの標準値であってもよい。対照レベルはまた、特定の用量の治療剤を用いた処置を受けた対象由来の試料において測定することもでき、ここで、その用量は、対象が目下評価中の時点では対象に投与されていない。対照は、評価中の対象に由来する場合もあり、異なる対象に由来する場合もある。

30

## 【0053】

細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CTLA-4)：CD152としても公知のタンパク質。CTLA-4は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。CTLA-4は、免疫チェックポイントとして機能し、したがって、免疫応答を下方調節するタンパク質受容体である。CTLA-4は、調節性T細胞 (Treg) において構成的に発現され、従来 of T細胞において活性化後に上方調節される。CTLA-4は、抗原提示細胞の表面上のCD80またはCD86に結合し、T細胞の阻害因子である。CTLA-4タンパク質およびCTLA-4をコードするmRNAの特定の非限定的な例は、例えば、参照により本明細書に組み込まれるGENBANK (登録商標) 受託番号NM\_001037631、2016年10月7日において開示されている。CTLA-4アンタゴニストは、CTLA-4の発現もしくは活性を低減する、または、例えばCTLA-4に特異的に結合し、CTLA-4が抗原提示細胞上の表面のCD80もしくはCD86に結合するのを阻害することによってCTLA-4のT細胞阻害機能を阻害する作用剤を含む。例示的な化合物としては、抗体 (例えば、抗CTLA-4抗体)、RNAi分子、アンチセンス分子、およびドミナントネガティブタンパク質が挙げられる。

40

## 【0054】

検出すること (detecting) または検出 (detection) (細胞または

50

生体分子) : 調査中の生体分子またはCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞などの特定の細胞型の存在を定量的または定性的に決定することを指す。例えば、対象由来の試料中のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の存在を定量的または定性的に決定すること。一般に、タンパク質、核酸などの生体分子の検出、または特定の細胞型もしくは細胞増殖を検出することには、単純な観察ではなく、生物学的アッセイを実施することが必要である。例えば、抗体または核酸プローブ(どちらも標識されていてよい)を利用するアッセイが、あるいはタンパク質または細胞をそれぞれ検出するために使用され得る。チェックポイント阻害剤によるなどの処置の有効性を診断すること(diagnosing)またはその診断(diagnosis)には、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞などの細胞または生体分子における有意な変化を検出することが伴う。

10

**【0055】**

DNA(デオキシリボ核酸) : DNAは、大多数の生きている生物体の遺伝子材料を含む長鎖ポリマーである(一部のウイルスは、リボ核酸(RNA)を含む遺伝子を有する)。DNAポリマー内の反復単位は4つの異なるヌクレオチドであり、そのそれぞれが4種の塩基、アデニン、グアニン、シトシンおよびチミンのうちの1種を含み、当該塩基が、リン酸基が結合したデオキシリボース糖と結合している。ヌクレオチドのトリプレット(コドンと称される)がポリペプチド内の各アミノ酸または停止シグナルをコードする。コドンという用語は、DNA配列が転写されるmRNAにおける3ヌクレオチドの対応する(および相補的な)配列に対しても使用される。

20

**【0056】**

別段の指定がない限り、DNA分子へのいかなる言及も、そのDNA分子の逆相補物を含むものとする。本明細書において一本鎖であることが求められる場合以外は、DNA分子は、一本鎖のみを示すように書かれていても、二本鎖DNA分子の両方の鎖を包含する。

**【0057】**

診断 : これだけに限定されないが、腫瘍などの病態の存在または性質を同定すること。診断方法は、それらの感度および特異度が異なる。診断アッセイの「感度」は、検査陽性であり、疾患にかかっている個体のパーセンテージである(真陽性のパーセント)。診断アッセイの「特異度」は、1から偽陽性率を引いたものであり、ここで、偽陽性率は、検査陽性であり、疾患を有さない個体の割合と定義される。特定の診断方法により状態の決定的な診断がもたらされるとは限らないが、方法により診断の助けとなる前向きな指標がもたらされれば十分である。「予後」は、腫瘍または転移などの病態の発症の確率(例えば、重症度)である。

30

**【0058】**

コードする : ポリヌクレオチドは、その天然の状態で、または当業者に周知の方法によって操作された場合に、それが転写および/または翻訳されて、ポリペプチドもしくはその断片のためのmRNAおよび/またはポリペプチドもしくはその断片を産生することができれば、ポリペプチドをコードするといえる。アンチセンス鎖はそのような核酸の相補物であり、それらからコード配列を推定することができる。

**【0059】**

フィーダー細胞 : 例えば培養皿の底部の細胞の層。フィーダー細胞は、栄養分、成長因子および/またはサイトカインを培養培地に放出し、T細胞などの他の細胞が相互作用できる基質を提供することができる。当該細胞は照射され得る。一実施形態では、フィーダー細胞は、照射された同種末梢血単核細胞である。

40

**【0060】**

免疫チェックポイント阻害剤 : 特定の型の免疫系細胞、例えばこれだけに限定されないがT細胞、および一部のがん細胞における生物学的経路を遮断する作用剤の一種。これらの阻害剤は、T細胞によるがん細胞の殺滅を阻害する。チェックポイント阻害剤が遮断されると、免疫系に対する「阻害」が低減し、T細胞ががん細胞に対して活性化される。T細胞またはがん細胞上に見いだされるチェックポイントタンパク質の例としては、PD-

50

1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3が挙げられる。

【0061】

免疫応答：刺激に対するB細胞、T細胞、または単球などの免疫系の細胞の応答。一実施形態では、応答は、特定の抗原に対して特異的である（「抗原特異的応答」）。一実施形態では、免疫応答は、CD4+応答またはCD8+応答などのT細胞応答である。別の実施形態では、応答はB細胞応答であり、特異的抗体の産生がもたらされる。

【0062】

「不応答性（unresponsiveness）」は、免疫細胞に関しては、活性化している受容体またはサイトカインによる刺激などの刺激に対する免疫細胞の不応性を含む。不応答性は、例えば、免疫抑制剤への曝露または高用量の抗原への曝露が原因で生じ得る。本明細書で使用される場合、「アネルギー」または「寛容（tolerance）」という用語は、活性化している受容体媒介性刺激に対する不応性を含む。そのような不応性は、一般に、抗原特異的であり、寛容化抗原（tolerizing antigen）への曝露が停止した後も持続する。例えば、T細胞におけるアネルギー（不応答性とは対照的に）は、サイトカイン産生（例えば、IL-2）の欠如を特徴とする。T細胞アネルギーは、T細胞が抗原に曝露し、第1のシグナル（T細胞受容体またはCD3媒介性シグナル）を第2のシグナル（共刺激シグナル）の非存在下で受けた場合に生じる。これらの条件下では、細胞は、同じ抗原に再曝露しても（曝露が共刺激分子の存在下で生じるとしても）サイトカインを産生できず、したがって、増殖できない。しかし、アネルギー性T細胞は、無関係の抗原に対しては応答を開始することができ、また、サイトカイン（例えば、IL-2）と共に培養した場合、増殖することができる。例えば、T細胞アネルギーは、また、ELISAによってまたはインジケータ細胞株を使用した増殖アッセイによって測定される場合のTリンパ球によるIL-2産生の欠如によっても観察され得る。あるいは、レポーター遺伝子構築物を使用することができる。例えば、アネルギー性T細胞は、5'IL-2遺伝子エンハンサーの制御下にある異種プロモーターによって、またはエンハンサー内に見いだすことができるAP1配列の多量体によって誘導されるIL-2遺伝子転写を開始することができない（Kang et al. Science 257:1134, 1992）。アネルギー性抗原特異的T細胞は、対応する対照抗原特異的T細胞と比べて細胞傷害活性が少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはさらには100%低下し得る。

【0063】

疾患の阻害または処置：腫瘍成長などの疾患の阻害とは、疾患の完全な発症を阻害することまたは疾患過程の生理学的影響を緩和することを指す。いくつかの実施例では、疾患の阻害または処置は、腫瘍または病原体による感染の症状の緩和を指す。例えば、がんの処置により、がんを有することが分かっている人における腫瘍随伴症候群の発症を防止すること、または腫瘍の徴候もしくは症状を緩和することができる。別の実施形態では、感染の処置とは、感染の発症を阻害することまたは感染の症状を緩和することを指し得る。「処置」は、疾患または疾患に関連する病態の徴候または症状を好転させる治療介入を指す。治療的ワクチン接種は、病原体にすでに感染している対象に作用剤を投与することを指す。対象は無症候性の場合があり、したがって、処置により症状の発症が防止される。

【0064】

単離された：「単離された」生物学的成分、例えば核酸、タンパク質（抗体を含む）または細胞は、当該成分が天然に存在する環境（例えば、他の細胞）中の他の生物学的成分、すなわち、他の染色体DNAおよびRNAおよび染色体外DNAおよびRNA、タンパク質および細胞小器官から実質的に分離または精製されている。「単離された」核酸およびタンパク質は、標準の精製方法によって精製された核酸およびタンパク質を含む。この用語はまた、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸およびタンパク質ならびに化学的に合成された核酸も包含する。

【0065】

リンパ球：体の免疫防御に関与する白血球（white blood cell）の一

10

20

30

40

50

種。2つの主要な型のリンパ球：B細胞およびT細胞が存在する。

【0066】

リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3) : CD223とも称される、ヒトにおいてLAG3遺伝子によってコードされるタンパク質。LAG-3は、T細胞機能に対して多様な生物学的効果を有する細胞表面分子であり、免疫チェックポイント受容体である。LAG3は、T細胞の細胞増殖、活性化、および恒常性を負に調節し、Treg抑制機能において役割を果たすことが報告されている。例示的なアミノ酸およびヒトLAG3をコードするmRNAは、参照により本明細書に組み込まれるGENBANK(登録商標)受託番号NM\_002286.5、2017年4月9日で提供される。

【0067】

哺乳動物：この用語は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方を含む。同様に、「対象」という用語は、ヒトおよび獣医学的対象の両方を含む。

【0068】

平均蛍光強度(フローサイトメトリー)：フローサイトメトリーは、散乱レーザー光であるか蛍光色素から放出される蛍光であるかにかかわらず、細胞または粒子の光強度の測定に関係する。光電子増倍管(PMT)によって光が検出され、その光は増幅器を介して元の蛍光強度に比例する電圧とPMTの電圧に変換される。連続分布であるこれらの電圧は、各シグナルを蛍光のレベルに応じて特定のチャンネルに入れるアナログデジタル変換器(ADC)によって不連続分布に変換される。ADCの分解能が大きいほど、これは、連続分布をより密接に反映する。

【0069】

フローサイトメトリーデータは、リニアスケールまたはログスケールのいずれかを使用して表示することができる。分布が右側に歪む大多数の生物学的状況ではログスケールの使用が指示される。この場合、効果は分布を正規化することである - それは対数正規と言われ、データが対数変換されている。線形シグナルは線形増幅器によって得られるが、対数変換は、対数増幅器によってまたはルックアップテーブル(LUT)を使用することによって実現することができる。分析用血球計算器における大多数のADCは10ビットであり、すなわち、データが $2 \times 10^4$ または $10^2 \times 4$ チャンネルに分割されるが、データのより大きな分解能をもたらすために12ビットまたは14ビットADCが使用される傾向が高まっている。

【0070】

単一のデータチャンネルからのデータ(散乱または蛍光)は、x軸が $10^2 \times 4$ チャンネルに分割される(10ビットADCについて)ヒストグラムとして表示される。データがリニアスケールである場合、チャンネル番号およびそのチャンネルについての線形値が容易に得られる。ログスケールでは、x軸は $10^2 \times 4$ チャンネルに分割されるにもかかわらず、 $5 \log_{10}$ (log decade)スケールとして表示される(一般に、 $5 \log_{10}$ が使用される)。

【0071】

フローサイトメトリーデータを定量するために、集団の分布の尺度を利用する。一般に、代表値(measures of central tendency)は平均値(mean)および中央値である。平均値は、「平均(average)」であり、算術平均値または幾何平均値であり得る。算術平均値は $\text{Sigma}(x)/n$ として算出され、幾何平均値は $n$ 乗根( $a_1 \times a_2 \times a_3 \dots a_n$ )として算出される。一般に、幾何平均値ではデータ分布の重み付けが考慮されるので、対数増幅データでは幾何平均値が使用され、算術平均値は線形データまたはリニアスケールで表示されるデータに対して使用される。中央値は中央の値、すなわち、値の半分が上にあり半分が下にある50パーセントイルである。「高」発現および「低」発現を有する細胞を集団全体の蛍光に応じて比較して決定することができる；これらのパラメーターは、フローサイトメトリーデータのプロット上に容易に視覚化される。

【0072】

培地(組織培養物または細胞培養物)：特定の細胞の集団の成長(細胞増殖/拡大)を

10

20

30

40

50

支持するために必要な栄養分を用いる培養条件の合成セット。培地は、一般に、炭素源、窒素源およびpHを維持するための緩衝剤を含む。一実施形態では、成長培地は、細胞成長を増強するために種々の栄養分を補充したRPMIなどの最小必須培地を含有する。さらに、最小必須培地には、ヒト、仔ウシまたはウシ胎仔血清などの添加物を補充することができる。

#### 【0073】

新形成、悪性病変、がんまたは腫瘍：新生物は、過剰な細胞分裂に起因する組織または細胞の異常な成長である。新生物の成長により、腫瘍が生じ得る。「がん」または「腫瘍」は、分化の喪失、成長速度の増加、周囲組織への浸潤を伴う特徴的な退形成を受けており、かつ、転移することが可能な新生物である。個体における腫瘍の量は、腫瘍の数、体積、または重量として測定することができる「腫瘍量」である。転移しない腫瘍は「良性」と称される。周囲組織に浸潤し、かつ/または転移し得る腫瘍は「悪性」と称される。転移性がんは、体内の、転移性がんが由来する元の（原発性）がんの起点部位以外の1つまたは複数の部位におけるがんである。

10

#### 【0074】

血液腫瘍の例としては、急性白血病（例えば、急性リンパ球性白血病、急性骨髄球性白血病、急性骨髄性白血病ならびに骨髄芽球性白血病、前骨芽球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病および赤白血病）、慢性白血病（例えば、慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病など、慢性骨髄性白血病、および慢性リンパ球性白血病）を含めた白血病、真性赤血球増加症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（無痛性および高悪性度の形態）、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、ヘアリー細胞白血病および脊髄形成異常症が挙げられる。

20

#### 【0075】

肉腫および癌などの固形腫瘍の例としては、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、および他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ系悪性腫瘍、膵がん、乳がん、肺がん、卵巣がん、前立腺がん、肝細胞癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、褐色細胞腫、脂腺癌、乳頭癌、乳頭状腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、ヘパトーマ、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣腫瘍、セミノーマ、膀胱癌、およびCNS腫瘍（例えば、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫（menangioma）、黒色腫、神経芽細胞腫および網膜芽細胞腫）が挙げられる。

30

#### 【0076】

いくつかの実施例では、腫瘍は、頭頸部扁平上皮細胞癌、肺がん、黒色腫、卵巣がん、腎細胞癌、膀胱がん、子宮頸がん、肝がん、前立腺がん、乳がん、神経膠芽腫または直腸がんである。

#### 【0077】

非経口：腸の外側への投与、例えば、消化管を経由しない投与。一般に、非経口製剤は、経口摂取以外の任意の可能性のある方式で投与される製剤である。この用語は、特に、静脈内投与であるか、くも膜下腔内投与であるか、筋肉内投与であるか、腹腔内投与であるか、関節内投与であるか、または皮下投与であるかにかかわらず、注射、ならびに、例えば鼻腔内適用、皮内適用、および局部適用を含めた種々の表面への適用を指す。

40

#### 【0078】

医薬品：対象または細胞に適正に投与された場合に所望の治療効果または予防効果を誘導することができる化学化合物または組成物。

#### 【0079】

薬学的に許容される担体：有用な薬学的に許容される担体は、従来のものである。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition, 1975に、本明細書において開示されている抗体の医薬送達に適した組成物および製剤が記載されている。

50

## 【 0 0 8 0 】

一般に、担体の性質は、使用される特定の投与形式に依存する。例えば、非経口製剤は、通常、例えば水、生理的食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどの薬学的にかつ生理的に許容される流体をビヒクルとして含む注射可能な流体を含む。固体組成物（例えば、粉剤・散剤（powder）、丸剤、錠剤、またはカプセル剤の形態）に関しては、従来の無毒性固体担体として、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムを挙げることができる。生物学的に中性の担体に加えて、投与される医薬組成物は、微量の無毒性補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、防腐剤、およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートを含み得る。

10

## 【 0 0 8 1 】

ポリヌクレオチド：ポリヌクレオチドまたは核酸配列という用語は、少なくとも10塩基の長さであるポリマー形態のヌクレオチドを指す。組換えポリヌクレオチドは、それが由来する生物体の天然に存在するゲノムではすぐ接しているコード配列（一方が5'末端上にあり一方が3'末端上にある）のどちらともすぐ接してはいないポリヌクレオチドを含む。したがって、この用語は、例えば、ベクターに組み入れられる；自律複製性プラスミドもしくはウイルスに組み入れられる；もしくは原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み入れられる、または他の配列とは独立した別々の分子（例えば、cDNA）として存在する、組換えDNAを含む。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはいずれかのヌクレオチドの修飾された形態であり得る。この用語は、DNAの一本鎖形態および二本鎖形態を包含する。

20

## 【 0 0 8 2 】

ポリペプチド：長さにも翻訳後修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）にもかかわらず、あらゆるアミノ酸の鎖。ポリペプチドは、3アミノ酸から30アミノ酸の間の長さであり得る。一実施形態では、ポリペプチドは、約7アミノ酸から約25アミノ酸までの長さである。さらに別の実施形態では、ポリペプチドは、約8アミノ酸から約10アミノ酸までの長さである。さらに別の実施形態では、ペプチドは、約9アミノ酸の長さである。ポリペプチドに関しては、「含む」とは、追加的なアミノ酸配列または他の分子が分子に含まれ得ることを示し、「から本質的になる」とは、追加的なアミノ酸配列は分子に含まれないが、他の作用剤（例えば、標識または化学化合物）が含まれ得ることを示し、「からなる」とは、追加的なアミノ酸配列および追加的な作用剤が分子に含まれないことを示す。

30

## 【 0 0 8 3 】

疾患を防止すること、処置すること、または好転させること：疾患を「防止すること（preventing）」とは、腫瘍などの疾患の完全な発症を阻害することを指す。「処置すること（treating）」とは、腫瘍量の減少または転移の数もしくはサイズ（the number of size）の低減など、疾患または病態の徴候または症状をそれが発症し始めた後に好転させる治療介入を指す。「好転させること（ameliorating）」は、がんなどの疾患の徴候または症状の数または重症度の低減を指す。

40

## 【 0 0 8 4 】

プログラム細胞死タンパク質（PD）-1：PD-1分子は、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーである。ヒトPD-1は、免疫グロブリンスーパーファミリードメイン、膜貫通ドメイン、および免疫受容体抑制性チロシンモチーフ（ITIM）を含む細胞内領域を含有する細胞外領域を有する（Ishida et al., EMBO J. 11:3887, 1992; Shinohara et al., Genomics 23:704, 1994; 米国特許第5,698,520号、参照により本明細書に組み込まれる）。これらの特徴により、gp49B、PIR-B、およびキラー抑制性受容体（KIR）も含む、免疫抑制性受容体と称される分子のより大きなファミリーも定義される（Vivier and Daeron (1997) Immunol. Today 18:286）。理論に束縛されることなく、これらの受容体のチロシルリン酸化ITIMモチーフは、S112ドメインを含有するホスファターゼと相互作用し、それにより阻害シ

50

グナルがもたらされると考えられている。これらの免疫抑制性受容体のサブセットは、KIRなどの主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)分子に結合し、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4)は、B7-1およびB7-2に結合する。ヒトでは、PD-1は、活性化誘導性アポトーシスを受けたT細胞株において最初に同定された50~55kDaのI型膜貫通型受容体である。PD-1は、T細胞、B細胞、およびマクロファージにおいて発現される。PD-1のリガンドは、B7ファミリーメンバーであるPD-リガンド1(PD-L1、B7-H1としても公知)およびPD-L2(B7-DCとしても公知)である。

#### 【0085】

*in vivo*では、PD-1は活性化T細胞、B細胞、および単球において発現される。実験データから、PD-1とそのリガンドの相互作用が中枢および末梢免疫応答の下方調節に関係づけられる。具体的には、PD-L1の存在下で、野生型T細胞の増殖は阻害されるが、PD-1欠損T細胞の増殖は阻害されない。さらに、PD-1欠損マウスは、自己免疫性の表現型を示す。例示的なヒトPD-1のアミノ酸配列は、Ishida et al., EMBO J. 11:3887, 1992; Shinohara et al. Genomics 23:704, 1994; 米国特許第5,698,520号)に記載されている。

10

#### 【0086】

PD-1の会合(例えば、架橋によるまたは凝集による)により、免疫細胞における阻害シグナルの伝達もたらされ、その結果、免疫細胞アネルギーが増大すると同時に免疫応答が低下する。PD-1は、2種のリガンド、PD-L1およびPD-L2に結合し、これらはどちらも、ポリペプチドのB7ファミリーのメンバーである、ヒトPD-1リガンドポリペプチドである。

20

#### 【0087】

PD-1アンタゴニストは、PDリガンド1(PD-L1)もしくはPDリガンド2(PD-L2)の発現もしくは活性を低減するまたはPD-1とPD-L1もしくはPD-L2の相互作用を低減する作用剤を含む。例示的な化合物としては、抗体(例えば、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、および抗PD-L2抗体)、RNAi分子(例えば、抗PD-1 RNAi分子、抗PD-L1 RNAi、および抗PD-L2 RNAiなど)、アンチセンス分子(例えば、抗PD-1アンチセンスRNA、抗PD-L1アンチセンスRNA、および抗PD-L2アンチセンスRNA)、ドミナントネガティブタンパク質(例えば、ドミナントネガティブPD-1タンパク質、ドミナントネガティブPD-L1タンパク質、およびドミナントネガティブPD-L2タンパク質)が挙げられる。例えば、参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第2008/083174号を参照されたい。

30

#### 【0088】

増殖：後代を生じるための細胞の分裂であり、当技術分野で公知のいくつかのやり方で測定することができる。このやり方としては、これだけに限定されないが、細胞の総数を計数するアッセイ、特定の細胞型の細胞の数を計数するアッセイ、Ki-67アッセイ、チミジン組み入れ、およびプロモデオキシウリジンアッセイが挙げられる。

40

#### 【0089】

精製された：精製されたという用語は、絶対的な純度を要求するものではなく、相対語として意図されている。したがって、例えば、精製されたペプチド調製物は、ペプチドまたはタンパク質が、そのペプチドまたはタンパク質が細胞におけるその天然の環境中にあるよりも富化されている調製物である。一実施形態では、タンパク質またはペプチドが調製物の総ペプチドまたはタンパク質含有量の少なくとも50%に相当するように調製物を精製する。実質的な精製とは、他のタンパク質または細胞成分からの精製を示す。実質的に精製されたタンパク質は、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%または98%純粋である。したがって、特定の非限定的な一実施例では、実質的に精製されたタンパク質は、90%は他のタンパク質や細胞成分を含まない。

#### 【0090】

50

試料（生体試料）：流体、組織、細胞、およびDNA、RNA、およびタンパク質などのその小成分を含有する生体試料を含む。例えば、一般的な試料は、腫瘍生検材料、骨髄、脾臓、リンパ節、血液、例えば、末梢血を含む（しかし、組織生検材料、摘出検体、穿刺吸引物、剖検材料などを含めた、 $CD8^+CD39^+CD103^+$  T細胞を単離することができる任意の他の供給源も含み得る）。

【0091】

特異的結合剤：実質的に定義された標的のみに結合する作用剤。一実施形態では、特異的結合剤は、PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3または4-1BBポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。

10

【0092】

「特異的に結合する」という用語は、PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3または4-1BBポリペプチドなどの抗原に関しては、抗体または他のリガンドが、全体または部分で、その抗原を有する細胞または組織に優先的に会合し、その抗原を欠く細胞または組織には会合しないことを指す。当然、分子と非標的細胞または組織との間に、ある特定の程度 of 非特異的相互作用が生じ得ることが認識される。それにもかかわらず、特異的結合は、抗原の特異的認識により媒介されるので、区別することができる。選択的に反応性の抗体は抗原に結合するが、低親和性での結合であり得る。特異的結合では、抗体（または他のリガンド）と抗原を有する細胞との間に、抗体（または他のリガンド）と抗原を欠く細胞との間におけるよりもはるかに強力な会合がもたらされる。特異的結合により、一般には、ポリペプチドを欠く細胞または組織と比較して、2倍よりも大きな、例えば、5倍よりも大きな、10倍よりも大きな、または100倍よりも大きな、ポリペプチドを有する細胞または組織に結合した抗体または他のリガンドの量の増加（単位時間当たり（per unit time））がもたらされる。そのような条件下でのタンパク質に対する特異的結合には、特定のタンパク質に対する特異性について選択された抗体が必要である。特定のタンパク質に対して特異的に免疫反応性である抗体または他のリガンドを選択するために種々のイムノアッセイ形式が適している。例えば、固相ELISAイムノアッセイが、タンパク質に対して特異的に免疫反応性であるモノクローナル抗体を選択するために常套的に使用される。特異的な免疫反応性を決定するために使用することができるイムノアッセイ形式および条件の説明に関しては、Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988)を参照されたい。

20

30

【0093】

対象：ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含めたヒトおよび獣医学的対象の両方を含むカテゴリーである、生きている多細胞の脊椎動物生物体。

【0094】

T細胞：免疫応答に重要な白血球。T細胞としては、これだけに限定されないが、 $CD4^+$  T細胞および $CD8^+$  T細胞が挙げられる。 $CD4^+$  Tリンパ球は、その表面上に「表面抗原分類4」（CD4）として公知のマーカーを有する免疫細胞である。これらの細胞は、ヘルパーT細胞としても公知であり、抗体応答ならびにキラーT細胞応答を含めた免疫応答の調整に役立つ。 $CD8^+$  T細胞は、「表面抗原分類8」（CD8）マーカーを有する。一実施形態では、 $CD8^+$  T細胞は、細胞傷害性Tリンパ球である。別の実施形態では、 $CD8^+$ 細胞は、サブレッサーT細胞である。T細胞は、抗原提示細胞上に提示された目的の特異的な抗原に応答し得る場合、「活性化されている」。

40

【0095】

T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン含有-3（TIM-3）：ヒトにおいてHAVCR2遺伝子によってコードされるタンパク質。TIM3は、マクロファージの活性化を調節し、マウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎の重症度を増強するTh1特異的細胞表面タンパク質である免疫チェックポイントである。Tim-3経路は、がんにおける消耗した $CD8^+$  T細胞においてPD-1経路と相互作用し得る。ヒトTIM-3に

50

ついで例示的な mRNA およびタンパク質配列は、参照により本明細書に組み込まれる GENBANK (登録商標) 受託番号 NM\_032782.4、2017年4月30日で提供される。

【0096】

治療有効量：処置される対象において所望の効果を実現するために十分である特定の物質の量。例えば、治療有効量は、腫瘍の成長を阻害または抑制するために必要な量であり得る。一実施形態では、治療有効量は、腫瘍を排除するため、腫瘍のサイズを縮小するため、または腫瘍の転移を防止するために必要な量である。対象に投与する場合、一般に、所望の *in vitro* における効果を実現されることが示されている標的組織中濃度 (例えば、腫瘍中濃度) が実現される投与量を使用する。

10

【0097】

特に説明がなければ、本明細書において使用される全ての科学技術用語は、本開示が属する技術分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。単数の用語「1つの (a)」、「1つの (an)」、および「その (the)」は、文脈によりそうでないことが明らかでない限り、複数の指示対象を包含する。同様に、「または」という単語は、文脈によりそうでないことが明白に示されない限り、「および」を含むものとする。したがって、「A または B を含む」は、A もしくは B を含むこと、または、A および B を含むことを意味する。核酸またはポリペプチドについて示される全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、および全ての分子量または分子質量の値は、おおよそであり、説明のために提示されていることもさらに理解されるべきである。本明細書に記載のものと同様または同等である方法および材料を本開示の実施または試験に使用することができるが、適切な方法および材料を下に記載する。本明細書において言及されている全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。GENBANK (登録商標) 受託番号は全て、2017年6月1日にデータベースにあるものとして参照により本明細書に組み込まれる。矛盾する場合は、用語の説明を含めた本明細書が支配する。さらに、材料、方法および実施例は単に例示的なものであり、それに限定されるものではない。

20

処置方法：養子免疫療法

【0098】

腫瘍を有する対象などの目的の対象を処置するための方法が本明細書に開示される。方法は、治療有効量の  $CD8^+ CD39^+ CD103^+ T$  細胞の投与を含む。対象における免疫応答を増大させる、例えば免疫系を増強するための方法が本明細書に開示される。本明細書に開示される精製された  $CD8^+ CD39^+ CD103^+ T$  細胞の投与により、対象の、腫瘍に対するなどの免疫応答を引き出す能力が増大する。したがって、対象由来の精製された選択された  $CD8^+ CD39^+ CD103^+ T$  細胞の集団を *ex vivo* で精製および生成し、これらの細胞の治療量を導入することにより、レシピエント対象の免疫応答が増強される。以下に考察する通り、追加的な作用剤を対象に投与することもできる。対象は、ヒトまたは獣医学的对象であり得る。

30

【0099】

一実施例では、方法は、ドナーから  $CD8^+ CD39^+ CD103^+ T$  細胞 (例えば、腫瘍生検材料由来の末梢血単核細胞または T 細胞) を含むドナー細胞の集団を単離するステップと、必要に応じて、細胞を増やすステップとを含む。治療有効量の  $CD8^+ CD39^+ CD103^+ T$  細胞をレシピエントに投与し、それにより、レシピエントにおいて腫瘍に対する免疫応答を生じさせる。そのような  $CD8^+ CD39^+ CD103^+ T$  細胞は、腫瘍関連抗原を含有する細胞を死滅させるまたは他の免疫細胞を補助することができる。一部の実施形態では、化学療法剤などの追加的ながん治療剤を投与することができる。

40

【0100】

いくつかの実施形態では、方法は、治療有効量の PD-1 アンタゴニスト、PD-L1 アンタゴニスト、CTLA-4 アンタゴニスト、BTLA アンタゴニスト、TIM-3 アンタゴニスト、LAG3 アンタゴニストおよび / または 4-1BB アゴニストを対象に投

50

与するステップも含む。PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM-3アンタゴニスト、LAG3アンタゴニストおよび/または4-1BBアゴニストの投与は、下に詳細に記載されている。治療量のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞および治療有効量のPD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM-3アンタゴニスト、LAG3アンタゴニストおよび/または4-1BBアゴニストの投与は、レシピエントの腫瘍の再発を防止するため、または腫瘍の再燃を処置するために、予防的に使用することができる。

#### 【0101】

一般に、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞は、自己である。しかし、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞は同種ドナー由来の適合するMHCとも反応し得る。一般に、T細胞は、CD3、CD8、CD39、およびCD103の発現について陽性である。例えば、異なるように染めた抗CD3抗体、抗CD8抗体、抗CD39抗体および抗CD103抗体を使用することにより、蛍光活性化細胞選別(FACS)を使用して、CD3、CD8、CD39およびCD103について陽性の細胞の集団を同定すること(および所望であれば選別すること)ができる。簡単に述べると、腫瘍生検材料由来の末梢血単核細胞またはT細胞などの細胞の集団を、抗CD103抗体、抗CD8抗体、抗CD39抗体および必要に応じて抗CD3抗体(それぞれに異なるフルオロフォアが結合している)の存在下で、抗体が細胞に結合するのに十分な時間にわたってインキュベートする。結合していない抗体を除去した後、細胞を、常套的な方法を使用してFACSによって分析する。特定の実施例では、得られるCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の集団は、CD8<sup>+</sup>陽性細胞の総集団と比べて、少なくとも30%純粋である、例えば、CD8陽性細胞の総集団と比べて少なくとも約50%純粋、少なくとも約60%純粋、少なくとも約70%純粋、少なくとも約80%純粋、少なくとも約90%純粋、少なくとも約95%純粋、または少なくとも約96%、約97%、約98%または約99%純粋である。したがって、投与される異種細胞はほんの限られた数だけである。細胞を1ラウンドよりも多くの細胞選別で処理することができる。T細胞の集団を、凍結保存前またはレシピエントへの注入前に、マイコプラズマ、無菌性、内毒素ならびに機能および純度に関する品質管理について試験することができる。

#### 【0102】

一実施形態では、1つまたは複数の細胞表面マーカーを特異的に向けられた標識抗体を使用して、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞および追加的なマーカーを発現するこれらの細胞の集団を同定、定量、および/または単離する。抗体は、これだけに限定されないが、酵素、磁気ビーズ、コロイド磁気ビーズ、ハプテン、蛍光色素、金属化合物、放射性化合物または薬物を含めた他の化合物とコンジュゲートすることができる。抗体とコンジュゲートすることができる酵素としては、これだけに限定されないが、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ウレアーゼおよび-ガラクトシダーゼが挙げられる。抗体とコンジュゲートすることができる蛍光色素としては、これだけに限定されないが、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、フィコエリトリン、アロフィコシアニンおよびテキサスレッドが挙げられる。抗体とコンジュゲートすることができる追加的な蛍光色素に関しては、Haugland, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, published by Molecular Probes, 9<sup>th</sup> Edition (2002)を参照されたい。抗体とコンジュゲートすることができる金属化合物としては、これだけに限定されないが、フェリチン、コロイド金、および特に、コロイド超常磁性ビーズが挙げられる。抗体とコンジュゲートすることができるハプテンとしては、これだけに限定されないが、ピオチン、ジゴキシゲニン、オキサゾロン(oxazalone)、およびニトロフェノールが挙げられる。抗体とコンジュゲートすることまたは抗体に組み入れることができる放射性化合物は当技術分野で公知であり、それらとして、これだけに限定されないが、テクネチウム99(<sup>99</sup>Tc)、<sup>125</sup>I、ならびに、これだけに限定されないが、<sup>14</sup>C、<sup>3</sup>Hおよび<sup>35</sup>Sを含めた任意の放射性核種を含むアミ

ノ酸が挙げられる。

【0103】

一部の実施例では、末梢血試料または腫瘍試料などの生体試料由来の細胞を適切に標識された抗体と接触させることによってCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を単離する。しかし、有効性が異なる他の技法を使用して所望の細胞の集団を精製および単離することができる。使用する分離技法は、収集される細胞の画分の生存能力の保持を最大にするものであるべきである。使用される特定の技法は、当然、分離の効率、方法の細胞傷害性、分離の容易さおよびスピード、ならびにどのような機器および/または技術的技能が要求されるかに依存する。

【0104】

フローサイトメーターによって生成されるデータを、1次元にプロットしてヒストグラムを作成すること、または2次元ドットプロットにおいてまたはさらには3次元にプロットすることができる。これらのプロット上の領域を、蛍光強度に基づいて、「ゲート」と称される一連のサブセット抽出を行うことによって逐次的に分離することができる。特定のゲーティングプロトコルが当技術分野で公知である。プロットは、一般に、ログスケールでなされる。異なる蛍光色素の発光スペクトルが重複するので、検出器におけるシグナルは電子的におよびコンピュータにより補正される。フローサイトメーターを使用して蓄積したデータは、FLOWJO（登録商標）またはBD FACSDiva（登録商標）などのソフトウェアを使用して解析することができる。解析は、別のコンピュータで行われることが最も多い。目的のタンパク質を高レベルまたは低レベルで発現する細胞の同定を可能にするゲーティングの原理は当技術分野で周知である。ゲートを確立するための学習に関するチュートリアルが、例えばFLOWJO（登録商標）ウェブサイトにおいて提供される。一般に、当業者はあらゆるFACS機械およびゲートを確立するためのデータ解析用のコンピュータプログラムを容易に使用して、特定のマーカーを発現する細胞を分離することができる。例として、当業者は、CD8の発現がない（CD8<sup>-</sup>）細胞、CD8の発現がある（CD8<sup>+</sup>）細胞を容易に同定することができる。

【0105】

追加的な分離手順は、抗体でコーティングされた磁気ビーズを使用する磁気分離、アフィニティークロマトグラフィー、モノクローナル抗体と結合させるかまたは補体と併せて使用する細胞傷害性剤、および固体マトリックスに結合させたモノクローナル抗体を利用する「パニング」、または別の慣習的な技法を含み得る。磁気ビーズおよび、アガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、中空繊維膜およびプラスチックペトリ皿などの他の固体マトリックスに結合させた抗体により、直接分離が可能になる。抗体が結合した細胞は、単に固体支持体を細胞懸濁液から物理的に分離することにより、細胞懸濁液から取り出すことができる。固相に連結した抗体と細胞とのインキュベーションの正確な条件および持続時間は、システムに特異的ないくつかの因子に依存する。しかし、適切な条件の選択は当技術分野において周知である。

【0106】

次いで、目的のマーカー（例えば、これだけに限定されないが、CD8、CD39、CD103、および必要に応じてCD3）を発現する細胞が固相に連結した抗体に結合するのを可能にするのに十分な時間後に、結合していない細胞を、生理的緩衝液を用いて溶出させるまたは洗い流すことができる。次いで、結合した細胞を、主に、使用される固相および抗体の性質に応じて、任意の適切な方法によって固相から分離し、当技術分野で周知の方法を使用して定量する。特定の非限定的な一実施例では、固相から分離した結合した細胞をFACSによって定量する（上記を参照されたい）。

【0107】

抗体を、支持体に結合させたアビジンもしくはストレプトアビジンを用いてその後に取り出すことができるビオチン、または蛍光色素とコンジュゲートすることができ、当技術分野で公知の通り、それらをFACSで使用して、細胞の分離および定量を可能にする。

【0108】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、自動アフェレーシス計器（例えば、CS-3000血液細胞分離器、Baxter Health Care、Deerfield、IL、または同等の機械）を使用するアフェレーシス手順を使用して対象から細胞を収集することができる。特定の非限定的な実施例では、1つまたは複数の細胞表面マーカーに特異的に向けられた標識抗体を使用して、本明細書に開示される細胞などのCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を同定し、定量する。

#### 【0109】

一部の実施形態では、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を、対象に投与する前に*in vitro*で増やす。拡大培養法（expansion method）は下に開示する。

#### 【0110】

本開示は、富化された（例えば、精製された）CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞および必要に応じてPD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM-3アンタゴニスト、LAG3アンタゴニストおよび/または4-1BBアゴニストを含む治療用組成物も提供する。組成物は、これだけに限定されないが、腫瘍を有する対象の処置などの、本明細書に開示される方法において有用である。特定の実施例では、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の集団を、それらを必要とする対象に投与するための治療用量形態にする。PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM-3アンタゴニスト、LAG3アンタゴニストおよび/または4-1BBアゴニストも、処置を必要とする対象に投与するための治療用量形態で提供される。

#### 【0111】

治療有効量のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を対象に投与する。治療有効量のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の特定の非限定的な例としては、対象1キログラム当たり細胞約 $1 \times 10^5$ 個から対象1キログラム当たり細胞約 $1 \times 10^9$ 個、例えば、1キログラム当たり細胞約 $1 \times 10^6$ 個から1キログラム当たり細胞約 $1 \times 10^8$ 個、例えば、1キログラム当たり細胞約 $5 \times 10^6$ 個から1キログラム当たり細胞約 $75 \times 10^6$ 個、例えば、1キログラム当たり細胞約 $25 \times 10^6$ 個、または1キログラム当たり細胞約 $50 \times 10^6$ 個の用量で投与される精製されたCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞が挙げられる。

#### 【0112】

精製されたCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞は、臨床医によって決定される通り、単回用量または複数回用量で投与することができる。例えば、細胞を、所望の応答および得られた応答に応じて、およそ1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間または毎月の間隔で投与することができる。一部の実施例では、所望の応答が得られたら、さらなるCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞は投与しない。しかし、レシピエントが腫瘍に関連する1つまたは複数の症状を示す場合、その時点で治療有効量のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を投与することができる。

#### 【0113】

投与は、局所的または全身性であり得る。一部の実施形態では、対象を化学療法で処置した後に細胞を静脈内投与する。他の実施形態では、投与された細胞の増殖を支持するために、対象にIL-2および/またはIL-15などのサイトカインも投与する。

#### 【0114】

本明細書に開示される精製されたCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を食塩水などの薬学的に許容される担体と共に投与することができる。PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM-3アンタゴニスト、LAG3アンタゴニストおよび/または4-1BBアゴニストも下記の通り薬学的に許容される担体中に製剤化することができる。これらは、単一の組成物として製剤化することもでき、2つの別々の組成物として製剤化することもできる。一部の実施例では、他の治療剤をT細胞と共に投与する。他の治療剤は、所望の効果に応じて、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞の投与前、投与中、または投与後に投与するこ

10

20

30

40

50

とができる。例示的な治療剤としては、これだけに限定されないが、抗菌剤、インターフェロン-アルファなどの免疫刺激薬、化学療法剤またはT細胞を *in vitro* で刺激するために使用されるペプチドワクチンが挙げられる。特定の例では、 $CD8^+CD39^+CD103^+$  T細胞を含有する組成物は、1つまたは複数の治療剤も含む。 $CD8^+CD39^+CD103^+$  T細胞の使用により、腫瘍体積、腫瘍転移、腫瘍再発を低減することができる。

#### 【0115】

一般に、方法は、良性腫瘍または悪性腫瘍などの腫瘍を有する対象を選択するステップと、対象に、治療有効量の(1)  $CD8^+CD39^+CD103^+$  T細胞および(2) 必要に応じて、PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM-3アンタゴニスト、LAG3アンタゴニスト、もしくはCTLA-4アンタゴニストなどのチェックポイント阻害剤アンタゴニスト、または4-1BBアゴニストを投与するステップとを含む。PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM-3アンタゴニスト、LAG3アンタゴニストもしくはCTLA-4アンタゴニスト、または4-1BBアゴニストは、一部の非限定的な実施例では、それぞれPD-1、PD-L1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、LAG3、BTLA、CTLA-4、または4-1BBに特異的に結合する抗体(またはその抗原結合性断片)であり得る。 $CD8^+CD39^+CD103^+$  T細胞は、腫瘍を処置するため、例えば、腫瘍体積を縮小させるため、転移を低減もしくは防止するため、良性腫瘍の悪性腫瘍への変換を予防するため、および/または腫瘍の再発を防止もしくは阻害するために有用である。投与は、局所的または全身性であり得る。適切な投与方法は臨床医には公知である。

10

20

#### 【0116】

一部の実施形態では、本明細書で提供される方法の利点は、 $CD8^+CD39^+CD103^+$  T細胞とPD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM-3アンタゴニスト、LAG3アンタゴニストおよび/もしくはCTLA-4アンタゴニストなどのチェックポイント阻害剤、または4-1BBアゴニストとを組み合わせることにより、がん治療のための活性薬剤の投与量を減少させることが可能になると同時に、治療のあらゆる対応する望ましくない副作用(例えば、細胞傷害性)も低減することが可能になる。さらなる実施形態では、本明細書で提供される方法の別の利点は、 $CD8^+CD39^+CD103^+$  T細胞とPD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM-3アンタゴニスト、LAG3アンタゴニストおよび/もしくはCTLA-4アンタゴニストなどのチェックポイント阻害剤、または4-1BBアゴニストとを組み合わせることにより、腫瘍を処置すること、例えば、腫瘍体積を縮小させること、転移を低減もしくは防止すること、良性腫瘍の悪性腫瘍への転換を予防すること、および/または腫瘍の再発を防止もしくは阻害することが可能になる。追加的な実施形態では、 $CD8^+CD39^+CD103^+$  T細胞とPD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM-3アンタゴニスト、LAG3アンタゴニストおよび/もしくはCTLA-4アンタゴニストなどのチェックポイント阻害剤、または4-1BBアゴニストとを組み合わせることにより、生存を増加させることが可能になる。

30

40

#### 【0117】

例えば、これだけに限定されないが、がん治療剤の追加的な作用剤を目的の対象に投与することもできる。例えば、これだけに限定されないが、腫瘍の外科的切除の追加的な処置を対象に施行することもできる。

#### 【0118】

対象を処置のために選択することができる。例えば、診断アッセイ(例えば、免疫組織化学的(IHC)アッセイ)を腫瘍(または腫瘍の試料)に対して実施して、対象が、開示されている処置方法に回答する可能性がある対象であると同定することができる。選択の方法は下に開示する。

50

## 【0119】

さらなる実施形態では、腫瘍がIHCアッセイによりPD-L1発現またはPD-L2発現について検査陽性である場合に、対象を処置のために選択する。PD-L1発現について検査陽性である腫瘍を検出するための例示的なアッセイは、そのそれぞれが参照により本明細書に組み込まれるTopalian et al. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N. Engl. J. Med. 366:2443-2454; Wolchok et al. 2013. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. N. Engl. J. Med. 369:122-133; Herbst et al. 2014. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature. 515:563-567; Garon et al. 2015. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. N. Engl. J. Med. 372:2018-2028; およびReck et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. N. Engl. J. Med. 375:1823-1833において提供される。

## 【0120】

腫瘍は、良性または悪性であり得る。腫瘍は、これだけに限定されないが、頭頸部扁平上皮細胞癌、肺がん、黒色腫、卵巣がん、腎細胞癌、膀胱がん、子宮頸がん、肝がん、前立腺がん、乳がん、神経膠芽腫または直腸がんを含めた任意の目的の腫瘍であり得る。肺がんは、小細胞肺癌または非小細胞肺癌であり得る。肝がんは、肝癌であり得る。乳がんは、トリプルネガティブ乳がんであり得る。一部の実施形態では、腫瘍は、鼻腔、副鼻腔、上咽頭、口腔、中咽頭、喉頭、下咽頭、唾液腺の腫瘍および傍神経節腫などの頭頸部腫瘍である。さらなる例は、皮膚腫瘍、脳腫瘍、子宮頸癌、精巣癌、胃腸管腫瘍、泌尿生殖器系腫瘍、婦人科系腫瘍、内分泌系腫瘍、軟部組織および骨の肉腫、中皮腫、黒色腫、中枢神経系の新生物、または白血病である。他の実施形態では、腫瘍は、非小細胞肺癌または小細胞肺癌などの肺腫瘍である。さらなる実施形態では、腫瘍は、食道、胃、膵臓、肝臓、胆樹、小腸、結腸、直腸および肛門領域のがんなどの胃腸管の腫瘍であり得る。さらに他の実施形態では、腫瘍は、腎臓、尿道、膀胱、前立腺、尿道、陰茎および精巣のがんなどの泌尿生殖器系の腫瘍であり得る。一部の実施形態では、腫瘍は、子宮頸部、膣、外陰部、子宮体、妊娠性絨毛疾患、卵巣、卵管、腹膜、または乳房のがんなどの婦人科の腫瘍である。他の実施形態では、腫瘍は、甲状腺腫瘍、副甲状腺の腫瘍、副腎皮質腫瘍、膵臓内分泌腫瘍、カルチノイド腫瘍およびカルチノイド症候群などの内分泌系腫瘍である。腫瘍は、軟部組織および骨の肉腫、中皮腫、皮膚のがん、皮膚黒色腫および眼内黒色腫を含めた黒色腫、中枢神経系の新生物、網膜芽細胞腫を含めた小児期のがん、ウィルムス腫瘍、神経線維腫症、神経芽細胞腫、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍、横紋筋肉腫であり得る。腫瘍は、非ホジキンリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、およびホジキン病を含めたリンパ腫であり得る。腫瘍は、急性白血病、慢性骨髄性白血病およびリンパ球性白血病などの白血病であり得る。腫瘍は、形質細胞新生物、原発部位不明がん、腹膜癌腫症、カボジ肉腫、AIDS関連リンパ腫、AIDS関連原発性中枢神経系リンパ腫、AIDS関連ホジキン病およびAIDS関連肛門生殖器のがん、肝臓への転移性がん、骨への転移性がん、悪性胸膜および心膜滲出ならびに悪性腹水であり得る。

## 【0121】

一部の実施形態では、腫瘍の処置は、腫瘍の診断後、または前兆の状態（例えば、異形成または良性腫瘍の発生）の開始後に開始される。処置は、がんの初期に開始することができ、例えば、対象に状態の症状が顕在化する前、例えばステージIの診断中または異形成が診断されたもしくは*in situ*における増殖性の状態が診断された時点に開始することができる。しかし、処置は、疾患の任意のステージ、例えば、これだけに限定されないが、ステージI、ステージII、ステージIIIおよびステージIVのがんにおいて開始することができる。一部の実施例では、悪性腫瘍またはさらには転移性腫瘍に転換する可能性がある良性腫瘍を有するこれらの対象に処置を施行する。

## 【0122】

状態が発症する前の処置、例えば、異形成または初期の（良性の）前兆の状態が検出されたときの処置は、本明細書では、状態が発症する「リスクがある」対象の処置と称される。一部の実施形態では、組成物の投与を、本明細書に記載の状態の発生中または発生後に実施することができる。腫瘍が発生するリスクがある対象に組成物を投与することができる。

#### 【0123】

腫瘍の存在は、当技術分野で公知の方法によって決定することができ、一般には、細胞学的評価および形態学的評価を含む。腫瘍は、確立された腫瘍であり得る。細胞は、生検材料から得た細胞を含めた、*in vivo*または*ex vivo*におけるものであり得る。

10

#### 【0124】

悪性のがんなどの状態の発症後に開始される処置では、状態のうちの1つの症状の重症度の低下、または症状の完全な除去、または転移、腫瘍体積もしくは腫瘍の数の低減をもたらすことができる。一部の実施例では、処置後に腫瘍が検出されなくなる。

#### 【0125】

本開示の一態様では、転移などの腫瘍の形成が遅延する、防止されるまたは低減する。別の態様では、原発腫瘍のサイズが縮小する。さらなる態様では、腫瘍の症状が低減する。さらに別の態様では、腫瘍体積が減少する。さらに別の態様では、腫瘍の再発が、例えば、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、12カ月、13カ月、14カ月、15カ月、16カ月、17カ月、18

20

#### 【0126】

一部の実施形態では、免疫応答を測定することができ、腫瘍体積を測定することができ、転移性病変の数を測定することができ、かつ/または腫瘍の症状を測定することができる。治療有効用量により、免疫応答を増大させること、腫瘍体積を減少させること、転移の数および/またはサイズを低減すること、および/または腫瘍の1つまたは複数の症状を低減することができる。

#### 【0127】

本開示の方法および組成物は一般にヒト対象を処置するために使用されるが、他の霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシなどの他の脊椎動物における同様または同一の疾患を処置するためにも使用することができる。適切な投与形式は、医療実践者により各対象に対して個別に決定されることが最良であろう。種々の薬学的に許容される担体およびそれらの製剤は、標準の製剤専門書、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin著に記載されている。Wang, Y. J. and Hanson, M. A., Journal of Parenteral Science and Technology, Technical Report No. 10, Supp. 42: 2S, 1988も参照されたい。医薬組成物の剤形は、選択される投与形式によって決定される。

30

#### 【0128】

CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞は、局所的にまたは全身的に、任意の経路によって投与することができる。例えば、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を、腫瘍内に、腹腔内に、静脈内に投与することができる。1つの非限定的な例では、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を静脈内に投与することができる。PD-1、PD-L1、PD-L2、BTLA、TIM-3、LAG3、またはCTLA-4アンタゴニスト（または4-1BBアゴニスト）も、非経口投与、例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、もしくは関節内注射もしくは注入、または舌下、経口、局部、鼻腔内、もしくは経粘膜投与によるもの、または肺吸入によるものを含めた任意の経路によって投与することができる。一部の実施形態では、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞および/またはPD-1、PD-L1、PD-L2、BTLA、TIM-3、LAG3、またはCTL

40

50

A - 4 アンタゴニストを、腫瘍が位置する組織に投与する、または腫瘍に直接投与する（腫瘍内）。例えば注射または注入用の非経口組成物を提供する場合、活性薬剤は、一般に、水性担体、例えば、pH 約 3.0 ~ 約 8.0、好ましくは pH 約 3.5 ~ 約 7.4、3.5 ~ 6.0、または 3.5 ~ 約 5.0 の等張性緩衝液中に懸濁させる。有用な緩衝液としては、クエン酸ナトリウム - クエン酸およびリン酸ナトリウム - リン酸、および酢酸ナトリウム - 酢酸緩衝液が挙げられる。治療有効量の調製物が、経皮注射または送達後に数時間または数日間にわたり血流中に送達されるようにレポジットリーまたは「デポー」型の緩徐放出調製物の形態を使用することができる。

#### 【0129】

ある特定の実施形態では、PD - 1、PD - L1、PD - L2、BTLA、TIM - 3、LAG3、またはCTLA - 4 アンタゴニスト（例えば、これだけに限定されないが、抗体または抗原結合性断片）、または4 - 1BB アゴニストを、約 0.01 ~ 10 mg / kg、0.01 ~ 5 mg / kg、0.01 ~ 1 mg / kg、0.01 ~ 0.1 mg / kg、1 ~ 10 mg / kg、1 ~ 5 mg / kg、1 ~ 3 mg / kg、0.5 ~ 1.0 mg / kg、0.05 ~ 0.5 mg / kg の範囲の用量で、毎日、1週間当たり2回もしくは3回、毎週、2週間ごと、3週間ごと、毎月などを限定することなく含めた投与の投薬スケジュール、または処置にあたる医師により適当であるとみなされる他の用量および投薬スケジュールに従って投与することができる。投与スケジュールが、治療的利益をもたらすために十分な生理的濃度の作用剤をもたらすものである限りは、併用療法の一部として、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を対象に、追加的な作用剤の前、その後、またはそれと同時に投与することができる。

#### 【0130】

一部の実施形態では、PD - 1またはPD - L1 アンタゴニスト（例えば、PD - 1またはPD - L1に特異的に結合する抗体または抗原結合性断片）を、約 0.01 ~ 10 mg / kg、0.01 ~ 5 mg / kg、0.01 ~ 1 mg / kg、0.01 ~ 0.1 mg / kg、1 ~ 10 mg / kg、1 ~ 5 mg / kg、1 ~ 3 mg / kg、0.5 ~ 1.0 mg / kg、0.05 ~ 0.5 mg / kg の範囲の用量で、毎日、1週間当たり2回もしくは3回、毎週、2週間ごと、3週間ごと、毎月などを限定することなく含めた投与の投薬スケジュール、または処置にあたる医師により適当であるとみなされる他の用量および投薬スケジュールに従って投与することができる。投与スケジュールが、治療的利益をもたらすために十分な生理的濃度の作用剤をもたらすものである限りは、併用療法の一部として、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞を対象に、PD - 1またはPD - L1 アンタゴニストの前、その後、またはそれと同時に投与することができる。ある特定の実施形態では、CTLA - 4 アンタゴニスト（例えば、CTLA - 4に特異的に結合する抗体または抗原結合性断片）を、約 0.01 ~ 10 mg / kg、0.01 ~ 5 mg / kg、0.01 ~ 1 mg / kg、0.01 ~ 0.1 mg / kg、1 ~ 10 mg / kg、1 ~ 5 mg / kg、1 ~ 3 mg / kg、0.5 ~ 1.0 mg / kg、0.05 ~ 0.5 mg / kg の範囲の用量で、毎日、1週間当たり2回もしくは3回、毎週、2週間ごと、3週間ごと、毎月などを限定することなく含めた投与の投薬スケジュール、または処置にあたる医師により適当であるとみなされる他の用量および投薬スケジュールに従って投与することができる。さらなる実施形態では、BTLA アンタゴニスト（例えば、BTLAに特異的に結合する抗体または抗原結合性断片）を、約 0.01 ~ 10 mg / kg、0.01 ~ 5 mg / kg、0.01 ~ 1 mg / kg、0.01 ~ 0.1 mg / kg、1 ~ 10 mg / kg、1 ~ 5 mg / kg、1 ~ 3 mg / kg、0.5 ~ 1.0 mg / kg、0.05 ~ 0.5 mg / kg の範囲の用量で、毎日、1週間当たり2回もしくは3回、毎週、2週間ごと、3週間ごと、毎月などを限定することなく含めた投与の投薬スケジュール、または処置にあたる医師により適当であるとみなされる他の用量および投薬スケジュールに従って投与

10

20

30

40

50

することができる。投与スケジュールが、治療的利益をもたらすために十分な生理的濃度の作用剤をもたらすものである限りは、併用療法の一部として、 $CD8^+CD39^+CD103^+$  T細胞を対象に、BTLAアンタゴニストの前、その後、またはそれと同時に投与することができる。追加的な実施形態では、LAG3またはTIM-3アンタゴニスト（例えば、LAG3またはTIM-3に特異的に結合する抗体または抗原結合性断片）を、約0.01~10mg/kg、0.01~5mg/kg、0.01~1mg/kg、0.01~0.1mg/kg、1~10mg/kg、1~5mg/kg、1~3mg/kg、0.5~1.0mg/kg、0.05~0.5mg/kgの範囲の用量で、毎日、1週間当たり2回もしくは3回、毎週、2週間ごと、3週間ごと、毎月などを限定することなく含めた投与の投薬スケジュール、または処置にあたる医師により適当であるとみなされる他の用量および投薬スケジュールに従って投与することができる。投与スケジュールが、治療的利益をもたらすために十分な生理的濃度の作用剤をもたらすものである限りは、併用療法の一部として、 $CD8^+CD39^+CD103^+$  T細胞を対象に、LAG3またはTIM-3アンタゴニストの前、その後、またはそれと同時に投与することができる。さらに他の実施形態では、4-1BBアゴニスト（例えば、4-1BBに特異的に結合する抗体または抗原結合性断片）を、約0.01~10mg/kg、0.01~5mg/kg、0.01~1mg/kg、0.01~0.1mg/kg、1~10mg/kg、1~5mg/kg、1~3mg/kg、0.5~1.0mg/kg、0.05~0.5mg/kgの範囲の用量で、毎日、1週間当たり2回もしくは3回、毎週、2週間ごと、3週間ごと、毎月などを限定することなく含めた投与の投薬スケジュール、または処置にあたる医師により適当であるとみなされる他の用量および投薬スケジュールに従って投与することができる。投与スケジュールが、治療的利益をもたらすために十分な生理的濃度の作用剤をもたらすものである限りは、併用療法の一部として、 $CD8^+CD39^+CD103^+$  T細胞を対象に、4-1BBアゴニストの前、その後、またはそれと同時に投与することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0131】

徐放性組成物を利用することができる。徐放性組成物の適切な例としては、適切なポリマー材料（例えば、造形品、例えばフィルムもしくはマイクロカプセルの形態の半透性ポリマーマトリックスなど）、適切な疎水性材料（例えば、許容される油中エマルションなど）またはイオン交換樹脂、およびわずかに可溶の誘導体（例えば、わずかに可溶の塩など）が挙げられる。徐放性製剤は、腫瘍の場所に依りて、経口的に、直腸に、非経口的に、槽内に（intracistemally）、腔内に、腹腔内に、局部に（粉剤・散剤、軟膏剤、ゲル剤、滴剤または経皮パッチによってなど）、頰側に、または経口もしくは経鼻スプレーとして投与することができる。

#### 【0132】

開示されている方法において有用な薬学的に許容される担体および賦形剤は、従来のものである。例えば、非経口製剤は、通常、例えば水、生理的食塩水、他の平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどの薬学的にかつ生理的に許容される流体ビヒクルである注射可能な流体を含む。含めることができる賦形剤は、例えば、ヒト血清アルブミンまたは血漿調製物などのタンパク質である。所望であれば、投与される医薬組成物は、微量の無毒性補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、防腐剤、およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートも含んでよい。そのような剤形の実際の調製方法は公知である、または当業者には明らかである。

#### 【0133】

キットも提供される。 $CD8^+CD39^+CD103^+$  T細胞および/またはPD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、TIM-3、BTLA、またはCTLA-4アンタゴニストは、的確な投与量の個々の投与に適した単位剤形に製剤化することができる。投与される活性化合物（複数可）の量は、処置される対象、苦痛の重症度、および投与の様式に依存し、処方を行う臨床医の判断に委ねることが最良である。これらの縛りの中で、投与される製剤は、ある量の活性成分（複数可）を処置される対象において所望の効果

を実現するために有効な量で含有する。例えば、慢性的投与が実現されるように、毎日、隔週、毎週、隔月または毎月などの定義された時間間隔にわたって、複数の処置が想定される。

#### 【0134】

サイトカイン、ケモカイン、または化学療法剤などの追加的な作用剤を投与することができる。これらを開示される医薬組成物に含めることができる。インターロイキン2 (IL-2)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) などのサイトカイン、またはインターフェロン (IFN) などのインターフェロンを投与することができる。一実施例では、がんを防止および処置するために、外科的処置を対象に施行することができる。一実施例では、この施行は、逐次的なものである。他の実施例では、この施行は、同時になされるものである。

10

#### 【0135】

化学療法剤の例は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、天然物、またはホルモンおよびそれらのアンタゴニストである。アルキル化剤の例としては、ナイトロジェンマスタード (例えば、メクロレタミン、シクロホスファミド、メルファラン、ウラシルマスタードまたはクロラムブシル)、スルホン酸アルキル (例えば、ブスルファン)、ニトロソ尿素 (例えば、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、またはダカルバジン) が挙げられる。代謝拮抗薬の例としては、葉酸類似体 (例えば、メトトレキサート)、ピリミジン類似体 (例えば、5-FUまたはシタラビン)、およびメルカプトプリンまたはチオグアニンなどのプリン類似体が挙げられる。天然物の例としては、ピンカルカロイド (例えば、ピンブラスチン、ピンクリスチン、またはビンデシン)、エピポドフィロトキシン (例えば、エトポシドまたはテニポシド)、抗生物質 (例えば、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、プレオマイシン、プリカマイシン、またはマイトマイシン (mitocycin) C)、および酵素 (例えば、L-アスパラギナーゼ) が挙げられる。種々雑多な作用剤の例としては、白金配位錯体 (例えば、シスプラチンとしても公知のシス-ジアミン-ジクロロ白金II)、置換尿素 (例えば、ヒドロキシウレア)、メチルヒドラジン誘導体 (例えば、プロカルバジン)、および副腎皮質抑制薬 (例えば、ミトタンおよびアミノグルテチミド) が挙げられる。ホルモンおよびアンタゴニストの例としては、副腎皮質ステロイド (例えば、プレドニゾン)、プロゲステロン (例えば、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、および酢酸メゲストロール (magestrol))、エストロゲン (例えば、ジエチルスチルベストロールおよびエチニルエストラジオール)、抗エストロゲン薬 (例えば、タモキシフェン)、およびアンドロゲン (例えば、テストステロンプロピオン酸エステルおよびフルオキシメステロン) が挙げられる。最も一般的に使用される化学療法薬の例としては、アドリアマイシン、アルケラン、Ara-C、BiCNU、ブスルファン、CCNU、カルボプラチナム、シスプラチナム、シトキサン、ダウノルピシン、DTIC、5-FU、フルダラビン、ハイドレア、イダルビシン、イホスファミド、メトトレキサート、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ナイトロジェンマスタード、タキソール (またはドセタキセルなどの他のタキサン)、ベルパン、ピンクリスチン、VP-16が挙げられ、いくつかのより新しい薬物として、ゲムシタビン (ジェムザール)、ハーセプチン、イリノテカン (カンプトサー、CPT-11)、ロイスタチン、ナベルピン、リツキサン、STI-571、タキソテレ、トポテカン (ハイカムチン)、ゼローダ (カペシタビン)、ゼヴァリンおよびカルシトリオールが挙げられる。使用することができる免疫調節物質の非限定的な例としては、AS-101 (Wyeth-Ayerst Labs.)、プロピリミン (Upjohn)、ガンマインターフェロン (Genentech)、GM-CSF (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子; Genetics Institute)、IL-2 (CetusまたはHoffman-LaRoche)、ヒト免疫グロブリン (Cutter Biological)、IMREG (Imreg of New Orleans, La. 製)、SK&F 106528、およびTNF (腫瘍壊死因子; Genentech) が挙げられる。一部の実施形態では、対象にソラフェニブを投与する。

20

30

40

50

## 【0136】

追加的な化学療法剤は、抗体であり得る。抗体は、凍結乾燥形態で提供し、投与前に滅菌水で再水化することができるが、既知濃度の滅菌溶液としても提供される。次いで、抗体溶液を、0.9%塩化ナトリウム、USPを含有する注入バッグに添加し、一般には、体重1kg当たり0.5~15mgの投与量で投与する。米国において1997年のRITUXAN（登録商標）の承認以来販売されてきた抗体薬物の投与における相当の経験が当技術分野において利用可能である。抗体は、プログラム死（PD）-1またはプログラム死リガンド（PD-L1）に特異的に結合し得る（以下を参照されたい）。抗体は、静脈内プッシュまたはボラスではなく、緩徐な注入によって投与することができる。一実施例では、より高い負荷用量を投与し、その後、維持用量をより低いレベルで投与する。例えば、4mg/kgである最初の負荷用量をおよそ90分にわたって注入し、その後、前の用量の忍容性が良好であった場合には、毎週の維持用量を4~8週間にわたり、2mg/kgで30分の期間にわたって注入する。

10

## 【0137】

処置レジメンは、外科手術、化学療法、放射線、または、CAMPATH、抗CD3抗体もしくは他の抗体治療、サイトキシン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、および照射などの他の免疫除去剤（immunoablative agent）、Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971に記載されているものなどのペプチドワクチンとの組合せも含む。例示的な化学療法剤としては、アントラサイクリン（例えば、ドキシソルピシン（例えば、リポソーム化ドキシソルピシン））、ピンカルカロイド（例えば、ピンラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ピノレルピン）、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、デカルバジン、メルファラン、イホスファミド、テモゾロミド）、免疫細胞抗体（例えば、アレムツズマブ（alemtuzamab）、ゲムツズマブ、リツキシマブ、トシツモマブ）、代謝拮抗薬（例えば、葉酸アンタゴニスト、ピリミジン類似体、プリン類似体およびアデノシンデアミナーゼ阻害剤（例えば、フルダラビン）を含む）、mTOR阻害剤、TNFRグルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質（GITR）アゴニスト、プロテアソーム阻害剤（例えば、アクラシノマイシンA、グリオトキシンまたはボルテゾミブ）、サリドマイドまたはサリドマイド誘導体（例えば、レナリドミド）などの免疫調節物質が挙げられる。

20

30

## 【0138】

併用療法における使用が考慮される一般的な化学療法剤としては、アナストロゾール（ARIMIDEX（登録商標））、ピカルタミド（CASODEX（登録商標））、プレオマイシン硫酸塩（BLENOXANE（登録商標））、プスルファン（MYLERAN（登録商標））、プスルファン注射液（BUSULFEX（登録商標））、カペシタピン（XELODA（登録商標））、N4-ペントキシカルボニル-5-デオキシ-5-フルオロシチジン、カルボプラチン（PARAPLATIN（登録商標））、カルムスチン（BICNU（登録商標））、クロラムブシル（LEUKERAN（登録商標））、シスプラチン（PLATINOL（登録商標））、クラドリピン（LEUSTATIN（登録商標））、シクロホスファミド（CYTOXAN（登録商標））またはNEOSAR（登録商標））、シタラビン、シトシンアラビノシド（CYTOSAR-U（登録商標））、シタラビンリポソーム注射（DEPOCYT（登録商標））、ダカルバジン（DTIC-DOME（登録商標））、ダクチノマイシン（アクチノマイシンD、コスメガン（Cosme gan））、ダウノルピシン塩酸塩（CERUBIDINE（登録商標））、ダウノルピシンクエン酸塩リポソーム注射（DAUNOXOME（登録商標））、デキサメタゾン、ドセタキセル（TAXOTERE（登録商標））、ドキシソルピシン塩酸塩（ADRIAMYCIN（登録商標））、RUBEX（登録商標）、エトポシド（VEPESID（登録商標））、リン酸フルダラビン（FLUDARA（登録商標））、5-フルオロウラシル（ADRUCIL（登録商標））、EFUDEX（登録商標）、フルタミド（EULEXIN（登録商標））、テザシチピン、ゲムシタピン（ジフルオロデオキシシチジン）、ヒ

40

50

ドロキシウレア (HYDREA (登録商標))、イダルビシン (IDAMYCIN (登録商標))、イホスファミド (IFEX (登録商標))、イリノテカン (CAMPTOSAR (登録商標))、L-アスパラギナーゼ (ELSPAR (登録商標))、ロイコボリンカルシウム、メルファラン (ALKERAN (登録商標))、6-メルカプトプリン (PURINETHOL (登録商標))、メトトレキサート (FOLEX (登録商標))、ミトキサントロン (NOVANTRONE (登録商標))、マイロターグ、パクリタキセル (TAXOL (登録商標))、フェニックス (イットリウム90/MX-DTPA)、ペントスタチン、カルムスチンインプラントを伴うポリフェプロサン20 (GLIADEL (登録商標))、クエン酸タモキシフェン (NOLVADEX (登録商標))、テニボシド (VUMON (登録商標))、6-チオグアニン、チオテバ、チラバザミン (TIRAZONE (登録商標))、注射用トポテカン塩酸塩 (HYCAMPTIN (登録商標))、ピンブラスチン (VELBAN (登録商標))、ピンクリスチン (ONCOVIN (登録商標))、およびビノレルビン (NAVELBINE (登録商標))が挙げられる。例示的なアルキル化剤としては、限定することなく、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、スルホン酸アルキル、ニトロソ尿素およびトリアゼン)：ウラシルマスタード (AMINOURACIL MUSTARD (登録商標))、CHLORETHAMINACIL (登録商標)、DEMETHYLDOPAN (登録商標)、DESMETHYLDOPAN (登録商標)、HAEMANTHAMINE (登録商標)、NORDOPAN (登録商標)、URACIL NITROGEN MUSTARD (登録商標)、URACILLOST (登録商標)、URACILMOSTAZA (登録商標)、URAMUSTIN (登録商標)、URAMUSTINE (登録商標)、クロルメチン (MUSTARGEN (登録商標))、シクロホスファミド (CYTOXAN (登録商標))、NEOSAR (登録商標)、CLAFEN (登録商標)、ENDOXAN (登録商標)、PROCYTOX (登録商標)、REVIMMUNE (商標)、イホスファミド (MITOXANA (登録商標))、メルファラン (ALKERAN (登録商標))、クロラムブシル (LEUKERAN (登録商標))、ピボプロマン (AMEDEL (登録商標))、VERCYTE (登録商標))、トリエチレンメラミン (HEMEL (登録商標))、HEXYLEN (登録商標)、HEXASTAT (登録商標))、トリエチレンチオホスホラミン、テモゾロミド (TEMODAR (登録商標))、チオテバ (THIOPLEX (登録商標))、ブスルファン (BUSILVEX (登録商標))、MYLERAN (登録商標))、カルムスチン (BICNU (登録商標))、ロムスチン (CEENU (登録商標))、ストレプトゾシン (ZANOSAR (登録商標))、およびダカルバジン (DTIC-DO ME (登録商標))が挙げられる。追加的な例示的なアルキル化剤としては、限定することなく、オキサリプラチン (ELOXATIN (登録商標))；テモゾロミド (TEMODAR (登録商標))およびTEMODAL (登録商標))；ダクチノマイシン (アクチノマイシン-D、COSMEGEN (登録商標))としても公知)；メルファラン (L-PAM、L-サルコリシン (sarclysin)、およびフェニルアラニンマスタード、ALKERAN (登録商標))としても公知)；アルトレタミン (ヘキサメチルメラミン (HMM)、HEXYLEN (登録商標))としても公知)；カルムスチン (BICNU (登録商標))；ペンダムスチン (TREANDA (登録商標))；ブスルファン (BUSULFEX (登録商標))およびMYLERAN (登録商標))；カルボプラチン (PARAPLATIN (登録商標))；ロムスチン (CCNU、CEENU (登録商標))としても公知)；シスプラチン (CDDP、PLATINOL (登録商標))およびPLATINOL (登録商標) - AQとしても公知)；クロラムブシル (LEUKERAN (登録商標))；シクロホスファミド (CYTOXAN (登録商標))およびNEOSAR (登録商標))；ダカルバジン (DTIC、DICおよびイミダゾールカルボキサミド、DTIC-DO ME (登録商標))としても公知)；アルトレタミン (ヘキサメチルメラミン (HMM)、HEXYLEN (登録商標))としても公知)；イホスファミド (IFEX (登録商標))；プレドニムスチン (Prednumustine)；プロカルバジン (MATULANE (登録商標))；メクロレタミン (ナイトロジェンマスタード、ムスチンおよび塩酸メクロレタミ

ン、MUSTARGEN（登録商標）としても公知）；ストレプトゾシン（ZANOSAR（登録商標））；チオテパ（チオホスホアミド、TESPAおよびTSPA、THIOPLEX（登録商標）としても公知）；シクロホスファミド（ENDOXAN（登録商標）、CYTOXAN（登録商標）、NEOSAR（登録商標）、PROCYTOX（登録商標）、REVIMMUNE（登録商標））；およびベンダムスチンHCl（TREANDA（登録商標））が挙げられる。例示的なmTOR阻害剤としては、例えば、テムシロリムス；リダフォロリムス（正式にはデフォロリムス（deferolimus）、（1R, 2R, 4S）-4-[(2R)-2[(1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28Z, 30S, 32S, 35R)-1, 18-ジヒドロキシ-19, 30-ジメトキシ-15, 17, 21, 23, 29, 35-ヘキサメチル-2, 3, 10, 14, 20-ペンタオキソ-11, 36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[30.3.1.0<sup>4,9</sup>]ヘキサトリアコンタ-16, 24, 26, 28-テトラエン-12-イル]プロピル]-2-メトキシシクロヘキシルジメチルホスフィネートとして公知であり、AP23573およびMK8669としても公知であり、PCT公開WO03/064383号に記載されている）；エベロリムス（AFINITOR（登録商標）またはRAD001）；ラパマイシン（AY22989、SIROLIMUS（登録商標））；セマピモド（simapimod）（CAS164301-51-3）；エムシロリムス、（5-〔2, 4-ビス〔(3S)-3-メチルモルホリン-4-イル〕ピリド〔2, 3-d〕ピリミジン-7-イル〕-2-メトキシフェニル）メタノール（AZD8055）；2-アミノ-8-〔トランス-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチル-ピリド〔2, 3-d〕ピリミジン-7(8H)-オン（PF04691502、CAS1013101-36-4）；ならびにN<sup>2</sup>-〔1, 4-ジオキソ-4-〔〔4-(4-オキソ-8-フェニル-4H-1-ベンゾピラン-2-イル)モルホリニウム-4-イル〕メトキシ〕ブチル〕-L-アルギニルグリシル-L-アスパルチル-L-セリン-、分子内塩（SF1126、CAS936487-67-1）、およびXL765が挙げられる。例示的な免疫調節物質としては、例えば、アフツズマブ（ROCHE（登録商標）から入手可能）；ペグフィルグラスチム（NEULASTA（登録商標））；レナリドミド（CC-5013、REVLIMID（登録商標））；サリドマイド（THALOMID（登録商標））、アクチミド（CC4047）；およびIRX-2（インターロイキン1、インターロイキン2、およびインターフェロンを含むヒトサイトカインの混合物、CAS951209-71-5、IRX Therapeuticsから入手可能）が挙げられる。例示的なアントラサイクリンとしては、例えば、ドキシソルピシン（Adriamycin（登録商標）およびRUBEX（登録商標））；プレオマイシン（LENOXANE（登録商標））；ダウノルピシン（ダウノルピシン塩酸塩、ダウノマイシン、およびルビドマイシン塩酸塩、CERUBIDINE（登録商標））；ダウノルピシンリポソーム（ダウノルピシクエン酸塩リポソーム、DAUNOXOME（登録商標））；ミトキサントロン（DHAD、NOVANTRONE（登録商標））；エビルピシン（ELLENCÉ（商標））；イダルピシン（IDAMYCIN（登録商標）、IDAMYCIN PFS（登録商標））；マイトマイシンC（MUTAMYCIN（登録商標））；ゲルダナマイシン；ハービマイシン；ラビドマイシン（ravidozomycin）；およびデスアセチルラビドマイシン（desacetyl ravidozomycin）が挙げられる。例示的なピンカルカロイドとしては、例えば、酒石酸ピノレルピン（NAVELBINE（登録商標））、ピンクリスチン（ONCOVIN（登録商標））、およびピンデシン（ELDISINE（登録商標））；ピンブラスチン（硫酸ピンブラスチン、ピンカロイコブラスチンおよびVLB、ALKABAN-AQ（登録商標）およびVELBAN（登録商標）としても公知）；ならびにピノレルピン（NAVELBINE（登録商標））が挙げられる。例示的なプロテオソーム阻害剤としては、ボルテゾミブ（VELCADE（登録商標））；カーフィルゾミブ（PX-171-007、（S）-4-メチル-N-（（S）-1-（（（S）-4-メチル-1-（（R）-2-メチルオキシラン-2-イル）-1-オキソペンタン-

2 - イル) アミノ) - 1 - オキソ - 3 - フェニルプロパン - 2 - イル) - 2 - ( ( S ) - 2 - ( 2 - モルホリノアセトアミド) - 4 - フェニルブタンアミド) - ペンタンアミド) ; マリゾミブ ( N P I - 0 0 5 2 ) ; イキサゾミブクエン酸エステル ( M L N - 9 7 0 8 ) ; デランゾミブ ( C E P - 1 8 7 7 0 ) ; および O - メチル - N - [ ( 2 - メチル - 5 - チアゾリル) カルボニル] - L - セリル - O - メチル - N - [ ( 1 S ) - 2 - [ ( 2 R ) - 2 - メチル - 2 - オキシラニル] - 2 - オキソ - 1 - ( フェニルメチル) エチル] - L - セリンアミド ( O N X - 0 9 1 2 ) が挙げられる。例示的な G I T R アゴニストとしては、例えば、G I T R 融合タンパク質および抗 G I T R 抗体 ( 例えば、二価抗 G I T R 抗体)、例えば、米国特許第 6 , 1 1 1 , 0 9 0 号、欧州特許第 0 9

10

0 5 0 5 号 B 1、米国特許第 8 , 5 8 6 , 0 2 3 号、P C T 公開 W O 2 0 1 0 / 0 0 3 1 1 8 号および同第 2 0 1 1 / 0 9 0 7 5 4 号に記載されている G I T R 融合タンパク質、または、例えば、米国特許第 7 , 0 2 5 , 9 6 2 号、欧州特許第 1 9 4 7 1 8 3 号 B 1、米国特許第 7 , 8 1 2 , 1 3 5 号、米国特許第 8 , 3 8 8 , 9 6 7 号、米国特許第 8 , 5 9 1 , 8 8 6 号、欧州特許第 E P 1 8 6 6 3 3 9 号、P C T 公開 W O 2 0 1 1 / 0 2 8 6 8 3 号、P C T 公開 W O 2 0 1 3 / 0 3 9 9 5 4 号、P C T 公開 W O 2 0 0 5 / 0 0 7 1 9 0 号、P C T 公開 W O 2 0 0 7 / 1 3 3 8 2 2 号、P C T 公開 W O 2 0 0 5 / 0 5 5 8 0 8 号、P C T 公開 W O 1 9 9 9 / 4 0 1 9 6 号、P C T 公開 W O 2 0 0 1 / 0 3 7 2 0 号、P C T 公開 W O 1 9 9 9 / 2 0 7 5 8 号、P C T 公開 W O 2 0 0 6 / 0 8 3 2 8 9 号、P C T 公開 W O 2 0 0 5 / 1 1 5 4 5 1 号、米国特許第 7 , 6 1 8 , 6 3 2 号、および P C T 公開 W O 2 0 1 1 / 0 5 1 7 2 6 号に記載されている抗 G I T R 抗体などが挙げられる。

20

C D 3 9 + C D 1 0 3 + C D 8 + T 細胞を増やす方法

【 0 1 3 9 】

C D 8 + C D 3 9 + C D 1 0 3 + T 細胞を *in vitro* で増やすことができる。一部の実施形態では、対象から単離した C D 8 + C D 3 9 + C D 1 0 3 + T 細胞を、グルタミン、血清、および抗生物質を含む組織培養培地中で培養して、初代培養物を形成することができる。一般に、細胞を適切な培養容器中に播種する。細胞 ( 複数可) を培養するために使用される培養容器としては、これだけに特には限定されないが、その中で T 細胞を培養することが可能である限りは、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリ皿、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マルチプレート、マルチウェルプレート、マイクロスライド、チャンバースライド、チューブ、トレー、C E L L S T A C K ( 登録商標) チャンバー、培養バッグ、およびローラーボトルを挙げることができる。細胞は、培養に関する必要性に応じて、少なくともまたは約 0 . 2、0 . 5、1、2、5、10、20、30、40、50 ml、100 ml、150 ml、200 ml、250 ml、300 ml、350 ml、400 ml、450 ml、500 ml、550 ml、600 ml、800 ml、1000 ml、1500 ml、またはその中で導き出せる任意の範囲の体積で培養することができる。一部の実施形態では、培養容器は、組織培養プレート、例えば、6 ウェル、24 ウェル、または 96 ウェルプレートであり得る。他の実施形態では、培養容器はバイオリアクターであり得、これは、細胞を繁殖させることができるように生物学的に活性な環境を支持する、*ex vivo* における任意のデバイスまたはシステムを指し得る。バイオリアクターは、少なくともまたは約 2、4、5、6、8、10、15、20、25、50、75、100、150、200、500 リットル、1、2、4、6、8、10、15 立法メートル、またはその中で導き出せる任意の範囲の体積を有し得、細胞の集団の成長を支持するために必要な栄養分と共に培養することができる。

30

40

【 0 1 4 0 】

一般に、細胞は、炭素源、窒素源および pH を維持するためのバッファを含む成長培地中で培養される。培地はまた、脂肪酸または脂質、アミノ酸 ( 例えば、非必須アミノ酸)

50

、ビタミン（複数可）、成長因子、サイトカイン、抗酸化剤物質、ピルビン酸、緩衝剤、および無機塩も含有し得る。例示的な成長培地は、T細胞成長を増強するために非必須アミノ酸およびビタミンなどの種々の栄養分を補充したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）またはESSENTIAL 8（商標）（E8（商標））培地などの最小必須培地を含有する。最小必須培地の例としては、これだけに限定されないが、イーグル最小必須培地（MEM）Alpha培地、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、ロズウェルパーク記念研究所培地（RPMI）-1640培地、199培地、およびF12培地が挙げられる。必要に応じて、これだけに限定されないが、ペニシリン、ストレプトマイシン、またはテトラサイクリンなどの抗生物質を培地に添加することができる。組織培養培地にグルタミンを添加することもできる。抗生物質およびアミノ酸などの添加物は、当技術分野で公知である。

10

**【0141】**

さらに、最小必須培地に、ヒト、ウシ胎仔またはウシ血清などの追加的な添加物を補充することができる。血清は、例えば、10～15%（体積/体積）の濃度で、例えば、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約11%、約12%、約13%、約14%、または約15%血清で含めることができる。血清は、ウシ胎仔血清であってよい。他の実施形態では、血清は、ヒトAB血清などのヒト血清である。

**【0142】**

あるいは、培地は無血清であってよい。他の場合では、成長培地は、血清代替物を含有し得る。例示的な血清代替物は、当技術分野で公知である。例えば、KNOCOUT（商標）血清代替物が、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第2002/0076747号に開示されている。血清に対する代替物としては、アルブミン（例えば、脂質リッチアルブミン、組換えアルブミンなどのアルブミン置換体、植物デンプン、デキストランおよびタンパク質加水分解産物）、トランスフェリン（または他の鉄輸送体）、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオグリセロール（thioglycerol）、またはそれに対する等価物を適切に含有する材料を挙げることができる。血清に対する代替物は、例えば国際公開WO98/30679号に開示されている方法によって調製することができる。

20

**【0143】**

培養物は、「ゼノフリー（XF）」であり得、これは、異種動物由来の成分を基本的に含まない培地または培養条件を指す。ヒト細胞の培養に関しては、マウスなどの非ヒト動物のあらゆるタンパク質が異種由来成分（xeno component）になる。したがって、一部の実施形態では、開示される条件は、ゼノフリーである。したがって、ヒト細胞の培養に関しては、ヒトAB血清を含む培養物は「ゼノフリー」であり得る。

30

**【0144】**

他の培養条件を適切に定義することができる。例えば、培養温度は、約30～40℃、例えば、少なくともまたは約31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃であってよいが、それらに特に限定されない。一実施形態では、細胞を37℃で培養する。CO<sub>2</sub>濃度は、約1～10%、例えば、約2%～5%、またはその中で導き出せる任意の範囲であり得る。1つの非限定的な例では、約5%のCO<sub>2</sub>濃度を利用する。

40

**【0145】**

初代培養物を、有効量の照射された同種フィーダー細胞およびインターロイキン（IL）-15またはIL-2などのサイトカインで刺激して、刺激されたT細胞を形成する。フィーダー細胞は、例えば、同種の照射末梢血単核細胞であってよい。ヒトフィーダー細胞を含めたフィーダー細胞は、例えば、4000radのガンマ照射で照射されたものであってよい。

**【0146】**

一部の実施形態では、細胞を、フィトヘマグルチニンなどのポリクローナルT細胞刺激物質でも刺激する。一部の非限定的な実施例では、1μg/ml～2μg/mlの濃度を

50

利用する。さらなる実施形態では、IL - 15 および / または IL - 2 などのサイトカインと PHA の両方を利用する。

【0147】

一部の実施形態では、約 1,000 ~ 約 2,000 個の CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T 細胞が照射同種 PBMC などの約 100,000 ~ 約 300,000 個の同種フィーダー細胞で刺激されるような比率を使用する。他の実施形態では、約 1,000 ~ 約 2,000 個の CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T 細胞が約 200,000 個の同種フィーダー細胞で刺激されるような比率を使用する。

【0148】

IL - 2 または IL - 15 などのサイトカインを培養物に含めることができる。一部の実施形態では、IL - 15 を約 5 ng/ml ~ 約 15 ng/ml の IL - 15 の濃度で使用することができる。一部の実施形態では、IL - 15 を約 7 ng/ml ~ 約 12 ng/ml の濃度で、例えば、約 7 ng/ml、約 8 ng/ml、約 9 ng/ml、約 10 ng/ml、約 11 ng/ml、または約 12 ng/ml の濃度で培養物に含める。1つの非限定的な例では、IL - 15 を約 10 ng/ml の濃度で含める。

10

【0149】

次いで、刺激された CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞培養物に新鮮な組織培養培地および IL - 15 および / または IL - 2 などのサイトカインを *in vitro* における拡大培養 (expansion) 全体を通して補給する。IL - 15 をこの組織培養培地に約 5 ng/ml ~ 約 50 ng/ml の IL - 15、例えば、約 10 ng/ml ~ 約 50 ng/ml の IL - 15 の濃度で含めることができる。一部の実施形態では、IL - 15 を培養物に約 7 ng/ml ~ 約 12 ng/ml の濃度、例えば、約 7 ng/ml、約 8 ng/ml、約 9 ng/ml、約 10 ng/ml、約 11 ng/ml、または約 12 ng/ml の濃度で含める。1つの非限定的な例では、IL - 15 を約 10 ng/ml の濃度で含める。他の例では、IL - 15 を約 20 ng/ml、約 30 ng/ml、約 40 ng/ml、または約 50 ng/ml の濃度で含める。

20

【0150】

細胞培養物は、任意の期間にわたって維持することができる。一部の実施形態では、15 ~ 30 日間培養した後、増えた CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞を収集する。

T 細胞受容体をコードする核酸を単離し、使用方法

30

【0151】

腫瘍細胞抗原に特異的に結合する T 細胞受容体 (TCR) をコードする核酸を単離するための方法が提供される。これらの方法は、腫瘍細胞抗原を発現する腫瘍を有する対象由来の試料から、CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞などの CD39<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞を単離するステップを含む。一部の実施形態では、腫瘍は、頭頸部扁平上皮細胞癌、肺がん、黒色腫、卵巣がん、腎細胞癌、膀胱がん、子宮頸がん、肝がん、前立腺がん、乳がん、神経膠芽腫または直腸がんなどの固形腫瘍である。対象は、ヒト対象または獣医学的対象であり得る。試料は、これだけに限定されないが、末梢血試料または腫瘍生検材料を含めた対象由来の任意の試料であり得る。CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞などの CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>T 細胞を単離するための方法は上に開示されている。

40

【0152】

一部の実施形態では、方法は、CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞などの CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>T 細胞を増やすステップを含む。CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞などの CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>T 細胞を *in vitro* で増やす方法も上に開示されている。他の実施形態では、CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞などの初代 CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>T 細胞を利用し、ここでは、その細胞は、*in vitro* で増やさない。

【0153】

方法は、CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞などの CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>T 細胞から TCR をコードする核酸分子をクローニングするステップをさらに含む。TCR をクローニングするための方法は、当技術分野で公知である、例えば、参照により本明細書に組み

50

込まれる米国特許第 8,697,854 号を参照されたい。TCR は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、通常、 $\alpha$ -サブユニットおよび  $\beta$ -サブユニットからなる。これらは、N 末端免疫グロブリン (Ig) 可変 (V) ドメイン 1 つ、Ig 定常 (C) ドメイン 1 つ、膜貫通 / 細胞膜にまたがる領域、および C 末端の短い細胞質尾部を有する。TCR  $\alpha$ -鎖および  $\beta$ -鎖のどちらの可変ドメインも超可変または相補性決定領域 (CDR) を 3 つ有するが、 $\beta$ -鎖の可変領域は、通常は抗原に接触せず、したがって、CDR とはみなされない追加的な超可変性の領域 (HV4) を有する。

#### 【0154】

CDR3 はプロセッシングされた抗原を認識する主要な CDR であるが、アルファ鎖の CDR1 も抗原性ペプチドの N 末端部分と相互作用することが示されている。 $\beta$ -鎖の CDR1 もペプチドの C 末端部分と相互作用する。CDR2 は、MHC を認識すると考えられる。 $\beta$ -鎖の CDR4 は、抗原認識には関与しないと考えられるが、超抗原と相互作用することが示されている。TCR ドメインの定常ドメインは、システイン残基が、2 つの鎖間の連結を形成するジスルフィド結合を形成する短い接続配列からなる。特異的な抗原に対する TCR の親和性により、それらが治療的に有用なものになる。例えば、腫瘍は、特異的な TCR を発現する T 細胞を用いた養子免疫療法を使用することによって有効に処置することができる。TCR をクローニングするため、および TCR をトランスフェクトした細胞を使用した養子免疫療法を使用するための方法は、PCT 公開 WO 2006/031221 号、米国特許第 5,906,936 号；PCT 公開 WO 97/32603 号；PCT 公開 WO 2007/065957 号、および PCT 公開 WO 2008/039818 号に開示されている。TCR をコードする核酸分子およびそのような受容体を含む T 細胞 (または NK 細胞) を生成する方法は、例えば、そのそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる、Brentjens et al., 2010, *Molecular Therapy*, 18:4, 666-668; Morgan et al., 2010, *Molecular Therapy*, published online February 23, 2010, pages 1-9; Till et al., 2008, *Blood*, 112:2261-2271; Park et al., *Trends Biotechnol.*, 29:550-557, 2011; Grupp et al., *N Engl J Med.*, 368:1509-1518, 2013; Han et al., *J. Hematol Oncol.*, 6:47, 2013; PCT 公開 WO 2012/079000 号、同 WO 2013/126726 号；および米国特許公開第 2012/0213783 号に開示されている。

#### 【0155】

一部の実施形態では、単一細胞 RNA 配列を T 細胞受容体または pair-seq (Adaptive) のために使用する。1 つの非限定的な例では、精製された T 細胞を、fluidigm または 10x ゲノミクス計器を使用して単離して単一細胞にする。次いで、T 細胞 DNA を増幅し、配列決定する。このプロセスのために T 細胞を抗原刺激する必要も抗原が提示されている必要もない。

#### 【0156】

適切なクローニングおよび配列決定技法のさらなる例、ならびに当業者を多くのクローニング訓練に方向付ける十分な指示は公知である (例えば、Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4<sup>th</sup> ed, Cold Spring Harbor, New York, 2012) および Ausubel et al. (*In Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, through supplement 104, 2013) を参照されたい)。生物学的試薬および実験機器の製造者による製品情報からも有用な情報をもたらされる。そのような製造者としては、SIGMA Chemical Company (Saint Louis, MO)、R&D Systems (Minneapolis, MN)、Pharmacia Amersham (Piscataway, NJ)、CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA)、Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)、Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD)、Fluka Chemica-Biochemika Analytika (F

10

20

30

40

50

luka Chemie AG、Buchsg, Switzerland)、Invitrogen (Carlsbad, CA)、およびApplied Biosystems (Foster City, CA)、ならびに多くの他の当業者に公知の商業的供給源が挙げられる。

#### 【0157】

TCRをコードする核酸配列は、任意の適切な方法によって調製することができる。配列全体がクローニングされ、分かたら、Narang et al., Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979のホスホトリエステル法; Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979のホスホジエステル法; Beaucage et al., Tetra. Lett. 22:1859-1862, 1981のジエチルホスホロアミダイト (diethylphosphoramidite) 法; 例えば、例えばNeedham-VanDevanter et al., Nucl. Acids Res.12:6159-6168, 1984に記載の自動合成機を使用する、Beaucage & Caruthers, Tetra. Letts. 22(20):1859-1862, 1981に記載の固相ホスホロアミダイトトリエステル法; ならびに、米国特許第4,458,066号の固体支持法などの方法による直接化学合成により調製することもできる。化学合成により一本鎖オリゴヌクレオチドが生成される。これを、相補配列とのハイブリダイゼーションによって、または一本鎖を鋳型として使用したDNAポリメラーゼによる重合によって、二本鎖DNAに変換することができる。

10

#### 【0158】

核酸は、増幅法によって調製することもできる。増幅法としては、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、リガーゼ連鎖反応 (LCR)、転写に基づく増幅系 (TAS)、自家持続配列複製系 (3SR) が挙げられる。多種多様なクローニング方法、宿主細胞、および *in vitro* 増幅法体系が当業者に周知である。本明細書に記載のポリペプチドをコードする核酸に、その生物学的活性を低下させることなく修飾を行うことができる。いくつかの修飾は、標的とする分子のクローニング、発現、または融合タンパク質への組み入れを容易にするために行われ得る。そのような修飾は当業者には周知であり、それらとして、例えば、終結コドン、開始部位をもたらすための、アミノ末端に付加されたメチオニン、慣習的に配置される制限部位を作製するための、いずれかの末端に置かれた追加的なアミノ酸、または精製ステップを補助するための追加的なアミノ酸 (例えば、ポリHis) が挙げられる。

20

#### 【0159】

TCRをコードする核酸分子を異種プロモーターに作動可能に連結することができる。TCRをコードする核酸分子を、宿主細胞において発現させるためにベクター (例えば、レンチウイルスベクターまたはガンマレトロウイルスベクター) に含めることができる。例示的な細胞は哺乳動物細胞であり、細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) などのT細胞およびNK細胞を含む。特定の非限定的な実施例では、細胞は、CD3<sup>+</sup>T細胞などのT細胞である。CD3<sup>+</sup>T細胞は、CD4<sup>+</sup>T細胞またはCD8<sup>+</sup>T細胞であり得る。

30

#### 【0160】

核酸分子を、細菌、植物、酵母、昆虫および哺乳動物細胞などの組換え操作された細胞において発現させることもできる。TCRを融合タンパク質として発現させることもできる。抗体および抗原結合性断片の発現および精製の方法は公知であり、本明細書にさらに記載されている (例えば、Al-Rubeai (ed), Antibody Expression and Production, Springer Press, 2011を参照されたい)。当業者は、E. coli、他の細菌宿主、酵母、およびCOS、CHO、HeLaおよび骨髓腫細胞株などの種々の高等真核細胞を含めた、タンパク質を発現させるために利用可能な多数の発現系に関する知識がある。「宿主細胞」という用語は、主題の宿主細胞の任意の後代も含む。複製中に変異が生じ得るので、全ての後代が親細胞と同一でない可能性があることが理解される。安定な移入、つまり、外来DNAを宿主において継続的に維持する方法は、当技術分野で公知である。本明細書に開示される通り、本開示の特定の実施形態は、TCRを発現するヒトT細胞およびヒトNK細胞などのT細胞を含む。これらのT細胞は、CD4<sup>+</sup>T細胞またはCD8<sup>+</sup>T細胞などのCD3<sup>+</sup>T細胞であり得る。

40

50

## 【0161】

プロモーター（構成的または誘導性のいずれか）に対するTCRをコードする核酸の発現、その後の発現カセットへの組み入れ。プロモーターは、サイトメガロウイルスプロモーターおよびヒトT細胞リンパ球向性ウイルスプロモーター（HTLV）-1を含めた任意の目的のプロモーターであってよい。必要に応じて、サイトメガロウイルスエンハンサーなどのエンハンサーを構築物に含める。カセットは、原核生物または真核生物のいずれかにおける複製および組込みに適したものであってよい。典型的な発現カセットは、タンパク質をコードするDNAの発現の調節に有用な特定の配列を含有する。例えば、発現カセットは、適切なプロモーター、エンハンサー、転写および翻訳ターミネーター、開始配列、タンパク質をコードする遺伝子の前の開始コドン（すなわち、ATG）、イントロンのスプライシングシグナル、mRNAの適切な翻訳を可能にするためにその遺伝子の正しい読み枠を維持するための配列、および終止コドンを含み得る。ベクターは、薬物耐性（例えば、アンピシリン耐性またはテトラサイクリン耐性）をコードするマーカーなどの選択マーカーをコードし得る。

10

## 【0162】

クローニングされた遺伝子の高レベルの発現を得るために、最小限で、転写を導くための強力なプロモーター、翻訳開始のためのリボソーム結合性部位（内部リボソーム結合配列）、および転写/翻訳ターミネーターを含有する発現カセットを構築することが望ましい。真核細胞に関しては、制御配列は、例えば免疫グロブリン遺伝子、HTLV、SV40またはサイトメガロウイルスに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサー、ならびにポリアデニル化配列を含み得、スプライドナーおよび/またはアクセプター配列（例えば、CMVおよび/またはHTLVスプライドナーおよびドナー配列）をさらに含み得る。

20

## 【0163】

宿主が真核生物の場合、リン酸カルシウム共沈、微量注射、エレクトロポレーション、リボソームに包まれたプラスミドまたはウイルスベクターの挿入などの従来の機械的な手順などの、DNAのトランスフェクション方法を使用することができる。カセットにより形質転換された細胞は、amp<sup>r</sup>遺伝子、gpt遺伝子、neo遺伝子およびhyg遺伝子などのカセット中に含有される遺伝子によって付与される抗生物質に対する耐性によって選択することができる。

30

## 【0164】

真核細胞は、TCRをコードするポリヌクレオチド配列と、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子などの選択可能な表現型をコードする第2の外來DNA分子とを共形質転換することもできる。別の方法は、シミアンウイルス40（SV40）、レンチウイルスまたはウシパピローマウイルスなどの真核生物ウイルスベクターを使用して、真核細胞を一過性に感染させるまたは形質転換し、タンパク質を発現させることである（例えば、Viral Expression Vectors, Springer press, Muzyczka ed., 2011を参照されたい）。当業者は、COS、CHO、HeLaおよび骨髓腫細胞株などの高等真核細胞を含めた細胞におけるタンパク質の産生に有用なプラスミドおよびベクターなどの発現系を容易に使用することができる。

40

## 【0165】

一部の実施形態では、TCRを発現させるためにウイルスベクターを利用する。ウイルスベクターとしては、これだけに限定されないが、シミアンウイルス40、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、レンチウイルスベクター、およびガンマレトロウイルスなどのレトロウイルスが挙げられる。レトロウイルスベクターにより、真核細胞に遺伝子移入するための高度に効率的な方法がもたらされる。さらに、レトロウイルスによる組込みは制御された様式で起こり、細胞当たり1つまたは少数のコピーの新しい遺伝情報の安定な組込みがもたらされる。理論に束縛されることなく、レンチウイルスベクターは、肝細胞などの非増殖性細胞に形質導入することができるという点で、マウス白血病ウイルスなどのオンコレトロウイルスに由来するベクターに勝る利点を有する。レンチウイル

50

スペクターは、免疫原性が低いというさらなる利点も有する。TCRを発現させるためのレンチウイルススペクターの使用は当技術分野で公知であり、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第2014/0050708号に開示されている。トランスポゾンを使用することができる。

#### 【0166】

一部の実施形態では、目的の対象に導入するための宿主細胞を産生する。宿主細胞は、末梢血リンパ球(PBL)もしくは末梢血単核細胞(PBMC)、精製されたT細胞、または精製されたNK細胞であり得る。T細胞は、培養されたT細胞、例えば、初代T細胞、または培養されたT細胞株由来のT細胞、例えば、Jurkat、SupT1など、または哺乳動物(例えば、TCR-T細胞が後で投与されるヒト患者)から得たT細胞などの任意のT細胞であってよい。ヒト対象などの哺乳動物の対象から得る場合、T細胞は、これだけに限定されないが、血液、骨髄、リンパ節、胸腺、または他の組織または流体を含めた多数の供給源から得ることができる。T細胞を精製のために富化するまたは精製することもできる。T細胞は、これだけに限定されないが、CD3<sup>+</sup>細胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>ダブルポジティブT細胞、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞、例えば、Th<sub>1</sub>細胞およびTh<sub>2</sub>細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞(例えば、細胞傷害性T細胞)、腫瘍浸潤性細胞、メモリーT細胞、ナイーブT細胞などを含めた、任意の型のT細胞であってよく、任意の発生段階のT細胞であってよい。T細胞は、CD8<sup>+</sup>T細胞またはCD4<sup>+</sup>T細胞などのCD3<sup>+</sup>T細胞であってよい。代替の実施形態では、細胞は、TCR-NK細胞が後で投与される対象と同じ対象から得たNK細胞などのNK細胞であってよい。一部の実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。他の実施形態では、細胞は、獣医学的对象に由来するものである。

10

20

#### 【0167】

本明細書に記載の少なくとも1つの宿主細胞を含む細胞の集団も提供される。細胞の集団は、TCRをコードする組換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞、少なくとも1つの他の細胞に加えて、例えば、いかなる組換え発現ベクターも含まない宿主細胞(例えば、T細胞)、またはT細胞以外の細胞、例えば、B細胞、マクロファージ、好中球、赤血球(erythrocyte)などを含む異種集団であってよい。あるいは、細胞の集団は、集団がTCRをコードする組換え発現ベクターを含む宿主細胞を主に含む(例えば、それから本質的になる)、実質的に均質な集団であってよい。集団は、集団の全ての細胞が組換え発現ベクターを含む単一の宿主細胞のクローンであり、したがって、集団の全ての細胞が組換え発現ベクターを含む、細胞のクローン集団であってよい。本発明の一実施形態では、細胞の集団は、本明細書に記載の組換え発現ベクターを含む宿主細胞を含むクローン集団である。T細胞は、CD8<sup>+</sup>T細胞またはCD4<sup>+</sup>T細胞などのCD3<sup>+</sup>T細胞であってよい。細胞はNK細胞であってよい。

30

#### 【0168】

細胞は、レシピエントに対して自己であってよい。レシピエントは、腫瘍を有するまたは腫瘍を有するリスクがあるレシピエントであってよい。レシピエントは、腫瘍に対する前処置を受けていてよい。腫瘍は、頭頸部扁平上皮細胞癌、肺がん、黒色腫、卵巣がん、腎細胞癌、膀胱がん、子宮頸がん、肝がん、前立腺がん、乳がん、神経膠芽腫または直腸がんなどの固形腫瘍であってよい。一部の実施形態では、自己T細胞またはNK細胞をヒト対象などの対象から単離し、単離されたTCRをこれらの細胞に導入する。次いで、これらの形質転換された細胞を対象に再導入する。このシナリオでは、ドナーとレシピエントは同じ対象である。対象は、ヒトであってよい。一部の実施形態では、対象に、クローニングされたTCRを発現するT細胞および/またはNK細胞を治療有効量で投与する。特定の実施形態では(参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20140271635号A1参照)、拡大培養および遺伝子改変の前に、T細胞の供給源を対象から得る。

40

#### 【0169】

一部の実施形態では、T細胞および/またはNK細胞は自己である。他の実施形態では、T細胞および/またはNK細胞は、同種である。次いで、上に開示されている通り、T

50

細胞および/またはNK細胞を対象に導入する。一実施形態では、形質導入の4日後、5日後、6日後、7日後、8日後、9日後、10日後、11日後、12日後、13日後、14日後、15日後に細胞がベクターを一過性に発現する。1つの非限定的な例では、エレクトロポレーションによってベクターをT細胞に形質導入する。

#### 【0170】

「対象」という用語は、免疫応答を引き出すことができる、生きている生物体（例えば、哺乳動物）を含むものとする。対象の例としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ブタ（および他の獣医学的対象）ならびに非ヒト霊長類が挙げられる。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含めたいくつもの供給源から得ることができる。他の実施形態では、任意の数の、当技術分野において利用可能なT細胞株を使用することができる。一部の実施形態では、対象に白血球アフェレーシスを行うことができ、ここで、白血球（leukocyte）を採取し、*ex vivo*において富化または枯渇させて、目的の細胞、例えば、T細胞および/またはNK細胞を選択および/または単離する。これらの細胞単離物を当技術分野で公知の方法によって増やし、TCR構築物が導入されるように処理し、それにより、クローニングされたTCRを発現する自己細胞を作製することができる。一態様では、これだけに限定されないが、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターを使用してTCR発現細胞を生成する。一部の非限定的な実施例では、T細胞および/またはNK細胞を、FICOLL（商標）分離などの任意の数の当業者に公知の技法を使用して対象から採取した血液の単位から得ることができる、または、細胞をアフェレーシスによって得ることができる。アフェレーシス産物は、一般には、T細胞を含めたリンパ球、単球、顆粒球、B細胞、NK細胞、他の有核白血球、赤血球（red blood cell）、および血小板を含有する。

10

20

#### 【0171】

アフェレーシスによって採取された細胞を、血漿画分を除去するため、および細胞をその後の処理ステップのために適切な緩衝液または培地に入れるために洗浄することができる。一部の非限定的な実施例では、細胞をリン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄する。代替的な実施例では、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠き得るまたは全てではないが多くの二価カチオンを欠き得る。カルシウムの非存在下での最初の活性化ステップにより、拡大された活性化がもたらされ得る。洗浄ステップは、半自動「フロールー」遠心分離（例えば、Cobe 2991 cell processor、Baxter CYTOMATE（登録商標）、またはHAEMONETICS CELL SAVER 5（登録商標））を製造者の指示に従って使用することによるものなどの当技術分野で公知の方法によって実現することができる。洗浄後、細胞を、バッファを伴うまたは伴わない食塩溶液などの種々の生体適合性緩衝液に再懸濁させることができる。あるいは、アフェレーシス試料の望ましくない成分を除去し、細胞を直接培養培地に再懸濁させることができる。

30

#### 【0172】

一部の実施形態では、T細胞を末梢血リンパ球から負の選択によって単離する。CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>、およびCD45RO<sup>+</sup> T細胞、ナイーブおよび/またはメモリーT細胞などの特定のT細胞の亜集団を正の選択または負の選択技法によってさらに単離することができる。例えば、T細胞を、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T、またはCD3/IL-2などの、抗CD3/抗CD28とコンジュゲートしたビーズと一緒に、所望のT細胞の正の選択のために十分な期間にわたってインキュベートすることによって単離することができる。例えば、米国特許出願公開第20140271635号A1を参照されたい。非限定的な実施例では、期間は、約24～約72時間およびその間の全ての整数値である。別の非限定的な実施例では、期間は、少なくとも24時間、36時間、48時間であるまたはそれよりも長い。例えば免疫無防備状態の個体からの単離など、他の細胞型と比較してT細胞がわずかであるあらゆる状況においてT細胞を単離するために、より長いインキュベーション

40

50

の時間を使用することができる。複数のラウンドの選択を使用することもできる。

【0173】

負の選択によるT細胞集団の富化は、負に選択される細胞に独特の表面マーカー向けられた抗体の組合せを用いて実現することができる。1つの方法は、負に選択される細胞上に存在する細胞表面マーカー向けられたモノクローナル抗体のカクテルを使用する負の磁気免疫粘着 (magnetic immunoadherence) またはフローサイトメトリーによる細胞選別および/または選択である。例えば、CD4+細胞を負の選択によって富化するためには、モノクローナル抗体カクテルは、一般には、CD8a、CD14、CD15、CD16、CD19、CD36、CD56、CD132、TCR / 、およびCD235a (グリコホリンA) に対する抗体を含む。CD8+細胞を負の選択によって富化するためには、モノクローナル抗体カクテルは、CD4、CD15、CD16、CD19、CD34、CD36、CD56、CD123、TCR / 、およびCD235aに対する抗体を含有する。1つまたは複数のサイトカインを発現するT細胞集団を選択することができる。細胞発現をスクリーニングするための方法は、PCT公開WO2013/126712号に開示されている。

10

【0174】

正の選択または負の選択による所望の細胞の集団の単離に関しては、細胞とビーズの最大の接触を確実にするために、細胞および表面 (例えば、ビーズなどの粒子) の濃度を変動させることができる。一部の実施形態では、1ml当たり細胞100万個の濃度を使用する。さらなる実施形態では、1ml当たり細胞1億個よりも多くを使用する。他の実施形態では、1ml当たり細胞1,000万個、1,500万個、2,000万個、2,500万個、3,000万個、3,500万個、4,000万個、4,500万個、5,000万個、6,500万個、7,000万個、7,500万個、8,000万個、8,500万個、9,000万個、9,500万個、または1億個の濃度を使用する。理論に束縛されることなく、高濃度を使用することにより、細胞収量の増加、細胞活性化、および細胞拡大をもたらすことができる。より低い濃度の細胞を使用することもできる。理論に束縛されることなく、T細胞と表面 (例えば、ビーズなどの粒子) の混合物を有意に希釈することにより、粒子と細胞との相互作用が最小化される。これにより、粒子に結合する所望の抗原を大量に発現する細胞が選択される。一部の実施形態では、使用される細胞の濃度は、1ml当たり $5 \times 10^6$ 個である。他の実施形態では、使用される濃度は、1ml当たり約 $1 \times 10^5$ 個から1ml当たり $1 \times 10^6$ 個まで、および間の任意の整数値であり得る。

20

30

【0175】

細胞を、ローテータにおいて、スピードを変動させ、2~10 または室温のいずれかで、様々な時間の長さにならってインキュベートすることができる。刺激のためのT細胞は洗浄ステップ後に凍結させることもできる。理論に束縛されることなく、凍結およびその後の解凍ステップにより、細胞集団内の顆粒球およびいくらかの程度までの単球が除去されることによってより均一な産物をもたらされる。血漿および血小板を除去する洗浄ステップ後、細胞を凍結用溶液に懸濁させることができる。多くの凍結用溶液およびパラメーターが、当技術分野で公知であり、この状況において有用であるが、方法の1つは、20% DMSO および8% ヒト血清アルブミンを含有するPBS、または10% デキストラン40 および5% デキストロース、20% ヒト血清アルブミン および7.5% DMSO、または31.25% PlasmaLyte-A、31.25% デキストロース5%、0.45% NaCl、10% デキストラン40 および5% デキストロース、20% ヒト血清アルブミン、および7.5% DMSO を含有する培養培地、または、例えば、Hespan およびPlasmaLyte A を含有する他の適切な細胞凍結培地を使用し、次いで、細胞を1分あたり1 の速度で-80 まで凍結させ、液体窒素貯蔵タンクの気相中に保管することを伴う。制御された凍結の他の方法ならびに-20 でのまたは液体窒素中の制御されない即座の凍結を使用することができる。米国特許出願公開第2014-0271635号A1を参照されたい。

40

50

## 【0176】

血液試料またはアフレーシス産物は、本明細書に記載のとおり増やした細胞が必要になり得るときよりも前の期間に対象から採取することができる。そのように、増やす予定の細胞の供給源を必要な任意の時点で収集し、T細胞などの所望の細胞を単離し、本明細書に記載のものなどのT細胞療法が有益である任意の数の疾患または状態に対するT細胞療法において後に使用するために凍結することができる。一態様では、血液試料またはアフレーシスを、一般に、健康な対象から取得する。ある特定の態様では、血液試料またはアフレーシスを、一般に、腫瘍などの疾患が発症するリスクがあるが、まだ疾患が発症していない健康な対象から取得し、目的の細胞を単離し、後で使用するために凍結する。ある特定の態様では、T細胞を増やし、凍結し、後の時点で使用することができる。ある特定の態様では、本明細書に記載のとおり腫瘍などの特定の疾患の診断の直後であるが任意の処置の前に、患者から試料を収集する。別の態様では、任意の数の関連する処置モダリティ前の対象由来の血液試料またはアフレーシスから細胞を単離する。ある特定の態様では、凍結保存された細胞を本明細書に記載の通り解凍し、洗浄し、室温で1時間静置した後に使用する。血液試料またはアフレーシス産物を必要な時に対象から収集し、凍結しない場合もある。一部の実施形態では、自己腫瘍を有するT細胞をその後のトランスフェクションおよび注入のために個体から単離する。

10

## 【0177】

T細胞は、一般に、例えば、米国特許第6,352,694号；同第6,534,055号；同第6,905,680号；同第6,692,964号；同第5,858,358号；同第6,887,466号；同第6,905,681号；同第7,144,575号；同第7,067,318号；同第7,172,869号；同第7,232,566号；同第7,175,843号；同第5,883,223号；同第6,905,874号；同第6,797,514号；同第6,867,041号；および米国特許出願公開第20060121005号に記載されている方法を使用して活性化し、増やすことができる。T細胞は、CD3/TCR複合体に関連するシグナルを刺激する作用剤およびT細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドが結合した表面と接触させることによって増やすことができる。T細胞はPHAを使用して増やすこともできる、または、バルクPBMCはCD3/28またはCD3/IL2をトランスフェクトすることができる。一部の非限定的な実施例では、T細胞集団を、例えば、表面上に固定化した抗CD3抗体もしくはその抗原結合性断片、もしくは抗CD2抗体と接触させることによって、またはカルシウムイオンフォアと併せてプロテインキナーゼC活性化因子（例えば、プリオスタチン）と接触させることによって、本明細書に記載の通り刺激することができる。T細胞の表面上のアクセサリー分子の共刺激のために、アクセサリー分子を結合するリガンドを使用する。例えば、T細胞の集団を、T細胞の増殖を刺激するために適切な条件下で抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させることができる。CD4+ T細胞またはCD8+ T細胞のいずれかの増殖を刺激するために、抗CD3抗体および抗CD28抗体。抗CD28抗体の例としては、9.3、B-T3、XR-CD28 (Diaclone、Besancon、France)が挙げられ、一般に当技術分野で公知の他の方法で使用できるのと同様に使用することができる (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol. Meth. 227(1-2):53-63, 1999)。他の方法は、同種の照射PBMCを、T細胞増殖を刺激するためにフィトヘマグルチニンと共に使用することを含む。

20

30

40

## 【0178】

TCRが単離されたら、様々なアッセイを使用して、適切な*in vitro*モデルおよび動物モデルにおける分子の活性、例えば、これだけに限定されないが、抗原刺激後にT細胞を増やす能力、再刺激の非存在下でT細胞拡大を持続させる能力、および抗がん活性を評価することができる。一部の実施形態では、これだけに限定されないが、1-1Bなどの活性化マーカーの上方調節を、フローサイトメトリーによってなどで評価する。

## 【0179】

50

方法は、対象に、医薬組成物の細胞、例えば、クローニングされた T C R を発現する T 細胞および / または N K 細胞を治療有効量で投与することを含む。腫瘍を有する対象などの、それを必要とする対象に、その後、化学療法または外科手術（がんに対して）または抗ウイルス剤（H I V 感染に対して）を用いた標準の処置を受けさせることができる。異種 T C R を発現する宿主細胞の投与により、腫瘍体積の減少、転移の減少、または腫瘍の徴候もしくは症状の低減などの、腫瘍の処置がもたらされ得る。

#### 【 0 1 8 0 】

医薬組成物は、T C R 発現宿主細胞、例えば、本明細書に記載の複数の T C R 発現宿主細胞を、1 つまたは複数の薬学的にまたは生理的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせて含み得る。T C R 発現宿主細胞は、C D 4 <sup>+</sup> および / または C D 8 <sup>+</sup> T 細胞などの C D 3 <sup>+</sup> T 細胞などの T 細胞、および / または N K 細胞であり得る。そのような組成物は、例えば、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸；抗酸化剤；E D T A またはグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；および防腐剤を含み得る。

10

#### 【 0 1 8 1 】

細胞に関しては、細胞の導入のために種々の水性担体、例えば、緩衝食塩水などを使用することができる。これらの溶液は、滅菌されており、一般に、望ましくない物質を含まない。これらの組成物は、従来の周知の滅菌技法によって滅菌することができる。組成物は、必要な場合、生理的条件に近づけるために、例えば pH 調整剤および緩衝剤、毒性調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどの薬学的に許容される補助物質を含有し得る。これらの製剤中の濃度は、広範に変動し得、特定の選択される投与形式および対象の必要性に応じて主に液量、粘度、体重などに基づいて選択される。

20

#### 【 0 1 8 2 】

一実施形態では、医薬組成物は、内毒素、マイコプラズマ、複製コンピテントレンチウイルス（R C L）、p 2 4、V S V - G 核酸、H I V g a g、抗 C D 8 / 抗 C D 3 9 / 抗 C D 1 0 3 でコーティングされたビーズ残留物、マウス抗体、プールされたヒト血清、ウシ血清アルブミン、ウシ血清、培養培地成分、ベクターパッケージング細胞またはプラスミド成分、細菌および真菌などの夾雑物を実質的に含まない、例えば、それが検出可能なレベルで存在しない。

30

#### 【 0 1 8 3 】

投与すべき組成物の的確な量は、医師が年齢、重量、腫瘍サイズ、転移の程度、および患者（対象）の状態の個体差を考察して決定することができる。一般に、本明細書に記載の T 細胞（および / または N K 細胞）を含む医薬組成物を、範囲内の全ての整数値を含めて体重 1 k g 当たり細胞  $1 0^4 \sim 1 0^9$  個、例えば、体重 1 k g 当たり細胞  $1 0^5 \sim 1 0^6$  個の投与量で投与できると明言することができる。例示的な用量は、1 k g 当たり細胞  $1 0^6$  個 ~ 1 k g 当たり細胞約  $1 \times 1 0^8$  個まで、例えば、1 k g 当たり細胞約  $5 \times 1 0^6$  個から 1 k g 当たり細胞約  $7.5 \times 1 0^7$  個まで、例えば、1 k g 当たり細胞約  $2.5 \times 1 0^7$  個、または 1 k g 当たり細胞約  $5.0 \times 1 0^7$  個である。

40

#### 【 0 1 8 4 】

組成物は、これらの投与量で 1 回または複数回、例えば、2 回、3 回、4 回、5 回、6 回、7 回、8 回、9 回、または 1 0 回、投与することができる。組成物は、一般に、免疫療法において公知の注入技法を使用することによって投与することができる（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照されたい）。組成物は、毎日、毎週、隔月または毎月、投与することができる。一部の非限定的な実施例では、組成物を静脈内投与用に製剤化し、複数回投与する。投与の量および頻度は、対象の状態、ならびに対象の疾患の型および重症度などの因子によって決定されるが、適切な投与量は、治験によって決定することができる。

50

## 【0185】

一実施形態では、TCRをT細胞またはNK細胞などの細胞に導入し、対象が細胞の最初の投与、および1回または複数回のその後の細胞の投与を受け、ここで、1回または複数回のその後の投与は、前の投与後15日未満、例えば、前の投与の14日後、13日後、12日後、11日後、10日後、9日後、8日後、7日後、6日後、5日後、4日後、3日後、または2日後に行う。一実施形態では、1週間当たり1回よりも多くの細胞の投与を対象（例えば、ヒト）にもたらし、1週間当たり、例えば、2回、3回、または4回のTCR発現細胞の投与を行う。一実施形態では、対象は、1週間当たり1回よりも多くのT細胞の投与を受け（例えば、1週間当たり2回、3回または4回の投与）（サイクルとも称される）、その後、1週間投与を行わず、次いで、対象にTCR発現細胞の1回または複数回の追加的な投与（例えば、1週間当たり1回よりも多くの細胞の投与）を行う。別の実施形態では、対象（例えば、ヒト対象）は、1サイクルよりも多くのサイクルのTCR発現細胞を受け、各サイクル間の時間は、10日未満、9日未満、8日未満、7日未満、6日未満、5日未満、4日未満、または3日未満である。一実施形態では、TCR発現細胞を1日おきに、1週間当たり3回の投与で投与する。別の実施形態では、TCR発現細胞を少なくとも2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間またはそれよりも多くの週にわたって投与する。患者に投与される上記の処置の投与量は、処置される状態および処置のレシピエントの的確な性質によって変動する。ヒト投与に関する投与量のスケールリングは技術分野で認められている慣例に従って実施することができる。

10

## 【0186】

一部の実施形態では、TCR改変T細胞を*in vivo*において複製して、長期間にわたり持続させることができ、それにより持続的な腫瘍制御をもたらすことができる。種々の態様では、対象に投与されるT細胞、またはこれらの細胞の後代は、対象において少なくとも4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、12カ月、13カ月、14カ月、15カ月、16カ月、17カ月、18カ月、19カ月、20カ月、21カ月、22カ月、23カ月、または対象へのT細胞の投与後数年にわたって持続する。他の実施形態では、細胞およびそれらの後代は、対象へのT細胞の投与後6カ月未満、5カ月未満、4カ月未満、3カ月未満、2カ月未満、または1カ月未満、例えば、3週間、2週間、1週間にわたって存在する。

20

## 【0187】

主題の組成物の投与は、注射、輸血、埋め込みまたは移植によるものを含めた任意の慣習的な様式で行うことができる。開示された組成物は経動脈的に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、結節内に、髄内、筋肉内に、静脈内（*i.v.*）注射によって、または腹腔内に患者に投与することができる。一部の実施形態では、組成物を患者に皮内または皮下注射によって投与する。他の実施形態では、本発明の組成物を*i.v.*注射によって投与する。組成物を腫瘍またはリンパ節に直接注射することもできる。

30

## 【0188】

一実施形態では、単離された細胞の集団を含有する組成物は、1つまたは複数の追加的な医薬品、例えば、1つまたは複数の抗菌剤（例えば、抗生物質、抗ウイルス剤および抗真菌剤）、抗腫瘍剤（例えば、フルオロウラシル、メトトレキサート、パクリタキセル、フルダラビン、エトポシド、ドキソルビシン、もしくはビンクリスチン）、枯渇剤（例えば、フルダラビン、エトポシド、ドキソルビシン、もしくはビンクリスチン）、またはアセチルサリチル酸、イブプロフェンもしくはナプロキセンナトリウムなどの非ステロイド性抗炎症剤、サイトカイン（例えば、インターロイキン2）、またはワクチンも含有し得る。多くの化学療法剤が現在当技術分野で公知である。一実施形態では、化学療法剤は、有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗薬、インターカレーティング抗生物質、成長因子阻害剤、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、抗生存剤、生物学的反応修飾物質、抗ホルモン薬、例えば、抗アンドロゲン薬、および抗血管新生剤からなる群から選択される。

40

## 【0189】

50

悪性病変の処置に関しては、方法は、対象に治療有効量の追加的ながん治療剤（化学療法剤および放射線を含む）を投与するまたは外科手術を施行することも含み得る。

【0190】

T CRを発現する細胞を外科手術、放射線、化学療法、または免疫療法と併せて投与することができる。適切な化学療法剤は、上に開示されている。T CRを発現する細胞を下で詳細に開示されている通りPD - 1、CTLA - 4、TIM - 3、LAG3、BTLAアンタゴニストおよび/または4 - 1BBアゴニストと共に投与することもできる。

検出および処置の方法

【0191】

CD39 + CD103 + CD8 T細胞などのCD39 + CD8 + T細胞の投与が診断および処置において有用であることが本明細書に開示される。これらの実施形態では、対象由来の生体試料中のCD39 + CD103 + CD8 T細胞などのCD39 + CD8 + T細胞を測定する。一部の実施形態では、試料は、末梢血試料または腫瘍生検材料である。対象は、ヒトまたは獣医学的对象などの任意の対象であり得る。さらなる実施形態では、対象は、腫瘍を有する、腫瘍を有する疑いがある、または腫瘍を有するリスクがある。腫瘍は固形腫瘍であり得る。一部の非限定的な実施例では、固形腫瘍は、頭頸部扁平上皮細胞癌、肺がん、黒色腫、卵巣がん、腎細胞癌、膀胱がん、子宮頸がん、肝がん、前立腺がん、乳がん、神経膠芽腫または直腸がんである。

10

【0192】

一部の実施形態では、腫瘍を有する対象が、これだけに限定されないが、生物学的反応修飾物質（例えば、サイトカインおよびケモカイン）、がんワクチン、化学療法剤、免疫療法剤、および放射線を含むがん治療剤に応答するかどうかを決定するための方法が開示される。一部の実施形態では、がん治療剤は、チェックポイント阻害剤、4 - 1BBアゴニストおよび/または放射線であり得る。がん治療剤は、化学物質（chemical）であり得る。当該方法を、対象が外科手術に応答するかどうかを検出するために使用することもできる。

20

【0193】

これらの方法は、対象由来の生体試料中のCD39 + CD103 + CD8 T細胞などのCD39 + CD8 + T細胞の存在を検出するステップを含み、生体試料中のCD39 + CD103 + CD8 T細胞などのCD39 + CD8 + T細胞の存在は、これだけに限定されないが、チェックポイント阻害剤、4 - 1BBアゴニスト、および/または放射線などのがん治療剤が対象における腫瘍の処置に有効であることを示す。当該方法により、対象が切除などの外科処置に応答することも示され得る。当該方法は、がん治療剤を対象に投与するステップ、または外科処置を実施するステップも含み得る。一部の非限定的な実施例では、がん治療剤は、チェックポイント阻害剤であり、これは、これだけに限定することなく、PD - 1アンタゴニスト、PD - L1アンタゴニスト、CTLA - 4アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM - 3アンタゴニストまたはLAG3アンタゴニストであり得る。適切なアンタゴニストは、以下に詳細に開示されている。適切な4 - 1BBアゴニストも以下に開示される。

30

【0194】

他の実施形態では、腫瘍を有する対象ががん治療剤を含むものなどの治療レジメンに応答するかどうかを決定するための方法が開示される。がん治療剤は、化学療法剤または放射線であり得る。がん治療剤は、PD - 1アンタゴニスト、PD - L1アンタゴニスト、CTLA - 4アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM - 3アンタゴニストもしくはLAG3アンタゴニストなどのチェックポイント阻害剤であり得る、または4 - 1BBアゴニストであり得る。一部の実施形態では、方法は、対象に第1の用量のがん治療剤を投与するステップと、対象由来の生体試料中のCD39 + CD103 + CD8 T細胞などのCD39 + CD8 + T細胞の数を決定するステップとを含む。生体試料中のCD39 + CD103 + CD8 T細胞などのCD39 + CD8 + T細胞の量が対照と比較して増加することは、第1の用量のがん治療剤が対象における腫瘍の処置に有効であることを

40

50

示す。

【0195】

さらなる実施形態では、腫瘍を有する対象ががん治療剤に応答するかどうかを決定するための方法が開示される。がん治療剤は、化学療法剤または放射線であり得る。がん治療剤は、PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM-3アンタゴニストもしくはLAG3アンタゴニストなどのチェックポイント阻害剤であり得る、または4-1BBアゴニストであり得る。これらの方法は、対象に第1の用量のがん治療剤を投与するステップと、対象由来の生体試料中のCD39+CD103+CD8 T細胞などのCD39+CD8+T細胞の数を決定するステップとを含み、生体試料中のCD39+CD103+CD8 T細胞などのCD39+CD8+T細胞の量が対照と比較して増加することは、第1の用量のがん治療剤が対象における腫瘍の処置に有効であることを示す。追加的な実施形態では、方法は、第2の用量のがん治療剤を対象に投与するステップであって、第1の用量が第2の用量と同じである、または第2の用量が第1の用量よりも低い、ステップをさらに含む。

10

【0196】

さらに他の実施形態では、腫瘍を有する対象を処置するための方法が開示される。これらの方法は、対象に第1の用量のがん治療剤を投与するステップと、対象由来の生体試料中のCD39+CD103+CD8 T細胞などのCD39+CD8+T細胞の数を決定するステップとを含む。生体試料中のCD39+CD103+CD8 T細胞などのCD39+CD8+T細胞の量が対照と比較して減少するまたは変化がないことは、第1の用量のがん治療剤が対象における腫瘍の処置に有効でないことを示す。第2の用量のがん治療剤を対象に投与し、ここで、第2の用量は第1の用量よりも高い、または第2の用量は第1の用量と同じである。

20

【0197】

一部の実施形態では、上記で考察した通り、対象は、腫瘍を有する、または腫瘍を発症するリスクがある。これらの対象は、医師などの当業者が適切な標準の方法によって同定することができる。開示されている方法は、目的の対象を選択するステップと、これだけに限定されないが、PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM-3アンタゴニストまたはLAG3アンタゴニストなどのチェックポイント阻害剤を含めた目的のがん治療剤を投与するステップとを含む。対象に4-1BBアゴニストを投与することもできる。当該方法により、外科処置に応答する対象を検出することができる。

30

【0198】

追加的な実施形態では、対象に、治療有効量のCD39+CD103+CD8 T細胞などのCD39+CD8+T細胞、および治療有効量のがん治療剤、例えば、これだけに限定されないが、チェックポイント阻害剤、例えば、PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、TIM-3アンタゴニストまたはLAG3アンタゴニストを投与する。追加的な実施形態では、対象に4-1BBアゴニストを投与することができる。本明細書に開示されるCD39+CD103+CD8 T細胞などの精製されたCD39+CD8+T細胞、およびチェックポイント阻害剤または4-1BBアゴニストの投与により、腫瘍などの病態を克服する対象の能力が増大する。細胞およびチェックポイント阻害剤は、単一の医薬組成物に含めることもでき、別々の医薬組成物に含めることもできる。したがって、対象からex vivoにおいてCD39+CD103+CD8 T細胞などのCD39+CD8+T細胞の集団を精製し、精製された集団を生成し、これらの細胞を導入することにより、レシピエント対象の免疫応答が増強される。治療有効量のチェックポイント阻害剤または4-1BBアゴニストの投与によってもレシピエントの免疫応答が増強される。したがって、化学療法剤または放射線が有効であるかどうかを決定するための本明細書に開示される方法は、上記の任意の治療法と組み合わせて（および任意の対象において）使用することができる。

40

50

## 【0199】

当該方法を使用して、対象に対して治療的に有効であるがん治療剤の用量を評価することもできる。例えば、本明細書に開示される方法を使用して、目的の対象に投与される用量を低減することができるかどうか、およびそれでもなお有効であるかどうかを決定することができる。本明細書に開示される方法を使用して、対象に投与される用量が低すぎ、したがって治療的に有効になるように増加させなければならないかどうかを決定することもできる。

## 【0200】

開示されている方法のいずれも、B細胞および/またはT細胞などの他の細胞型を測定するステップを含み得る。開示されている方法は、PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3またはLAG3などのマーカーの発現を測定するステップも含み得る。CD8、CD39および/またはCD103の発現を評価する。

10

## 【0201】

一部の実施形態では、CD39+CD103+CD8 T細胞などのCD39+CD8+T細胞を測定する。生体試料由来のCD39+CD103+CD8 T細胞などのCD39+CD8+T細胞の数が対照と比較して増加することは、当該用量のがん治療剤が対象の処置に有用であることを示し、CD39+CD103+CD8 T細胞などのCD39+CD8+T細胞の数に対照と比較した有意な変更がないことは、当該用量のがん治療剤が対象を処置するために有用でないことを示す。対照は、以前に決定された標準値、またはがん治療剤の投与前の対象由来の試料中のCD39+CD103+CD8 T細胞などのCD39+CD8+T細胞の量、または対象が対照物質を投与された場合の対象由来の試料中のCD39+CD103+CD8 T細胞などのCD39+CD8+T細胞の量であり得る。

20

## 【0202】

一般に、CD39+CD103+CD8 T細胞などのCD39+CD8+T細胞の数の測定は、対象由来のT細胞を含む試料を得ること、および試料中のCD39+CD103+CD8 T細胞などのCD39+CD8+T細胞の存在または数を決定することを含む。一部の実施例では、試料は、生検試料、血液試料、または末梢血単核細胞の試料である。方法は、免疫組織化学的検査および/またはフローサイトメトリーを含む。

30

## 【0203】

方法は、対象由来の生体試料に対するものなどの免疫組織化学的方法を含み得る。試料は、腫瘍試料であり得る。一部の実施形態では、CD8、CD39またはCD103に結合する抗体などの抗体（または抗原結合性断片）を検出可能な標識で直接標識する。別の実施形態では、CD8、CD39またはCD103に結合する抗体（または抗原結合性断片）（第1の抗体）を標識せず、第1の抗体に結合する抗体に結合し得る第2の抗体または他の分子を利用する。当業者には周知である通り、特定の種およびクラスの第1の抗体に特異的に結合することができる第2の抗体を選択する。例えば、第1の抗体がヒトIgGである場合、二次抗体は、抗ヒト-IgGであり得る。抗体に結合し得る他の分子としては、限定することなく、プロテインAおよびプロテインGが挙げられ、どちらも商業的に入手可能である。

40

## 【0204】

抗体または二次抗体に対する適切な標識は、上記されており、種々の酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、磁気作用剤および放射性材料が挙げられる。適切な酵素の非限定的な例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。適切な補欠分子族複合体の非限定的な例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる。適切な蛍光材料の非限定的な例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン(dichlorotriazinylamine)フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられる。非限定的な例示的な発光材料はルミノールであり、非限

50

定的な例示的な磁気作用剤はガドリニウムであり、非限定的な例示的な放射性標識としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^3\text{H}$ が挙げられる。

#### 【0205】

フローサイトメトリーを使用して細胞を定量化することもできる。追加的な実施形態では、例えば、CD8<sup>+</sup> T細胞またはCD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞などのCD39<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞などのT細胞を分離するために、試料を精製することができる。一部の実施形態では、方法は、CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞などのCD39<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞の量を測定するステップを含む。一部の実施例では、生体試料中のCD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞などのCD39<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞の量を対照と比較する。適切な対照は上記されている。

10

#### 【0206】

一部の実施例では、細胞懸濁液を腫瘍試料から作製する。1つの非限定的な例では、滅菌条件下で、腫瘍を小片にカットし、ヒアルロニダーゼ、コラゲナーゼ、DNaseならびにヒト血清アルブミンを含むRPMI-1640中で消化する。細胞を、例えば、室温で1時間、磁気攪拌子で攪拌しながら消化することができる。細胞懸濁液を、細胞フィルターを通して濾過する。腫瘍浸潤性リンパ球を、密度勾配溶液を用いて遠心分離によって富化することができる。

#### 【0207】

T細胞を単離、検出、および/または定量化するための方法が当技術分野で公知であり、例示的なプロトコールが本明細書に提示される。T細胞の増殖を測定するための方法も当技術分野で公知である。これらの方法は、一般に、分子および/または生化学的技法の使用を伴い、単純な視覚的観察は伴わない。一部の実施例の細胞では、蛍光活性化細胞分析(FACS)を利用する。FACSを使用して、細胞を適切に標識された抗体で染色することによってT細胞などの細胞を選別する(単離する)ことができる。一実施形態では、いくつかの抗体(例えば、CD8、CD39およびCD103に結合する抗体)およびFACS選別を使用して、実質的に精製されたCD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞などのCD39<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞の集団を作製することができる。任意のFACS技法を使用することができる。例えば、米国特許第5,061,620号に開示されているFACSの方法を参照されたい。

20

#### 【0208】

しかし、有効性が異なる他の技法を使用して所望の細胞の集団を精製および単離することができる。使用される分離技法は、採取される細胞の画分の生存能力の保持を最大にするものであるべきである。使用される特定の技法は、当然、分離の効率、方法の細胞傷害性、分離の容易さおよびスピード、ならびにどのような機器および/または技術的スキルが要求されるかに依存する。

30

#### 【0209】

分離手順としては、抗体でコーティングされた磁気ビーズを使用する磁気分離、モノクローナル抗体と結合させるかまたは補体と併せて使用する細胞傷害性剤、および固体マトリックスに結合させたモノクローナル抗体を利用する「パニング」、または別の慣習的な技法が挙げられる。磁気ビーズおよび、アガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、中空繊維膜およびプラスチックペトリ皿などの他の固体マトリックスに結合させた抗体により、直接分離が可能になる。抗体が結合した細胞は、単に固体支持体を細胞懸濁液から物理的に分離することにより、細胞懸濁液から取り出すことができる。固相に連結した抗体と細胞とのインキュベーションの正確な条件および持続時間は、使用されるシステムに特異的なくいくつかの因子に依存する。しかし、適切な条件の選択は、十分に当技術分野の技能の範囲内である。

40

#### 【0210】

次いで、目的のマーカー(例えば、CD39またはCD103)を発現する細胞が固相に連結した抗体に結合するのに十分な時間後に、結合していない細胞を、生理的緩衝液を用いて溶出させるまたは洗い流すことができる。次いで、結合した細胞を、主に、使用さ

50

れる固相および抗体の性質に応じて、任意の適切な方法によって固相から分離する。

【0211】

抗体を、支持体に結合させたアビジンもしくはストレプトアビジンを用いてその後に取り出すことができるビオチン、または蛍光色素とコンジュゲートすることができ、当技術分野で公知の通り、FACSで使用して、細胞の分離を可能にする。

【0212】

例えば、CD8またはCD3を発現する細胞を最初に、CD8またはCD3の細胞表面発現によって他の細胞から分離する。次いで、単離されたCD8<sup>+</sup>細胞またはCD3<sup>+</sup>細胞の純度を、それが所望であれば、例えばBD LSRFORTESSA（登録商標）フローサイトメーター（Becton Dickinson, San Jose, CA）を用いて確認する。一実施形態では、細胞の集団のFACS選別などのさらなる精製ステップを実施する。一実施例では、この選別を、CD39、CD103、およびCD8の発現を検出するために実施することができる。

10

【0213】

方法は、細胞増殖を測定するステップも含み得る。細胞増殖の評価などの細胞増殖を分析するための方法は当技術分野で公知である。例えば、*ex vivo*において目的の細胞を蛍光色素で化学的標識することを含む膜色素希釈手法を利用することができる。トリチウム標識されたヌクレオシド類似体（一般に、<sup>3</sup>H-チミジンデオキシリボヌクレオシド、<sup>3</sup>H-TdR）またはプロモデオキシウリジン（BrdU）を用いた標識を利用することができる。BrdU組み入れを測定するためにFACS分析が利用可能である。DNA含有量および細胞周期関連タンパク質などの増殖の代理マーカーを使用することもできる。

20

【0214】

一実施例では、Ki67またはPCNAの測定を利用することができる。Ki67抗原は、活動性細胞周期の全ての期（G1、S、G2およびM期）の増殖している細胞によって発現されるプロトタイプ細胞周期関連核タンパク質である。静止（G0）細胞には存在しない。Ki67抗体は、増殖の確立において有用である。Ki67抗体を使用して、増殖している細胞および静止細胞を定量することができる（Ki67指数）。Ki67は、細胞周期進行および増殖のマーカーとして常套的に使用される；Ki67に対する抗体は、例えばABCAM（登録商標）から市販されており、これらの抗体を免疫組織化学的およびFACS分析において使用するための方法が入手可能である。

30

【0215】

他の方法を使用して、サンプリングの時点で活動性細胞周期にある細胞を検出することができる。CD39+CD8+T細胞、例えば、CD39+CD103+CD8<sup>+</sup>T細胞などのリンパ球の増殖を、細胞を含めた生体試料中のDNAを標識するために安定な同位元素を利用する方法を使用することによって測定することもできる。DNAは新規の合成経路によって均一にかつ高度に標識される。使用される安定な同位元素標識、例えば、<sup>2</sup>H-グルコースまたは重水（<sup>2</sup>H<sub>2</sub>OまたはH<sub>2</sub><sup>18</sup>O）は動物およびヒトに対して無毒性であり、一般に、米国食品医薬品局（US Food and Drug Administration）（FDA）により安全であるとみなされている（米国特許出願公開第2009/0155179号を参照されたい）。リンパ球DNAへの安定な同位元素標識の組み入れの測定は、以下のステップを含む：（i）DNAの抽出またはさらなる単離を伴わないクロマチンからのDNAの放出、DNAのデオキシリボヌクレオチドへの加水分解、（ii）プリンデオキシリボヌクレオチドからのデオキシリボースの選択的放出、（iii）プリンデオキシリボースの、ガスクロマトグラフィー/質量分析（GC/MS）による分析に適した揮発性誘導体（例えば、ペンタンテトラアセテート、ペンタフルオロベンジルテトラアセチル誘導体、または別の適切な誘導体）への誘導体化、（iv）前記誘導体のGC/MS分析、（v）前記誘導体の質量アイソトポマー存在量のパターンの分析、および（vi）前記パターンからの、安定な同位元素組み入れの尺度である過剰な富化値の算出。これらの方法のそれぞれの特定の実施形態が教示されている（米国特許第

40

50

5, 910, 40号を参照されたい)。

PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG3、BTLAアンタゴニストおよび4-1BBアゴニスト

【0216】

PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、LAG3アンタゴニスト、TIM-3アンタゴニストおよび/またはBTLAアンタゴニストなどのチェックポイント阻害剤は、例えば、CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞と組み合わせて、本明細書に開示される方法において有用である。4-1BBアゴニストも本明細書に開示される方法において有用である。PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、LAG3アンタゴニスト、TIM-3アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、および/または4-1BBアゴニストは化学的または生物学的化合物であり得る。作用剤は、これだけに限定されないが、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を含めた抗体であり得る。適切なアンタゴニストおよびアゴニストは、これらの抗体の抗原結合性断片も含む(抗原結合性断片の説明については上記を参照されたい)。アンタゴニストは、例えば、阻害剤核酸分子または小分子、例えば、900ダルトン未満または800ダルトン未満の分子であり得る。

10

【0217】

PD-1アンタゴニストは、細胞上に発現されるPD-L1またはPD-L2と免疫細胞(T細胞、B細胞またはNK細胞)上に発現されるヒトPD-1との結合を遮断する任意の化学化合物または生体分子であり得る。PD-1およびそのリガンドの代替名または同義語として、PD-1についてはPDCD1、PD1、CD279およびSLEB2; PD-L1についてはPDCD1L1、PD-L1、B7H1、B7-4、CD274およびB7-H; ならびにPD-L2についてはPDCD1L2、PDL2、B7-DC、BtdcおよびCD273が挙げられる。例示的なヒトPD-1アミノ酸配列は、NCBI受託番号: NP\_\_005009に見いだすことができる。例示的なヒトPD-L1およびPD-L2アミノ酸配列は、参照により組み込まれるNCBI受託番号: それぞれNP\_\_054862およびNP\_\_079515、2017年4月28日に見いだすことができる。in vivoでは、PD-1は、活性化T細胞、B細胞、および単球上に発現される。ヒトでは、PD-1は、活性化誘導性アポトーシスを受けるT細胞株において最初に同定された50~55kDaのI型膜貫通型受容体である。PD-1は、T細胞、B細胞、およびマクロファージ上に発現される。PD-1のリガンドは、B7ファミリーメンバーであるPD-リガンド1(PD-L1、B7-H1としても公知)およびPD-L2(B7-DCとしても公知)である。PD-L1またはPD-L2阻害剤を本明細書に開示される方法において使用することができる。

20

30

【0218】

実験データによりPD-1とそのリガンドの相互作用が中心および末梢免疫応答の下方調節に関係づけられる。具体的には、PD-L1の存在下で、野生型T細胞の増殖は阻害されるが、PD-1欠損T細胞の増殖は阻害されない。(例えば、参照により本明細書に組み込まれるIshida et al., EMBO J. 11:3887, 1992; Shinohara et al. Genomics 23:704,1994; 米国特許第5,698,520号を参照されたい)。

40

【0219】

追加的なPD-1アミノ酸配列は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,808,710号および米国特許出願公開第2004/0137577号、同第2003/0232323号、同第2003/0166531号、同第2003/0064380号、同第2003/0044768号、同第2003/0039653号、同第2002/0164600号、同第2002/0160000号、同第2002/0110836号、同第2002/0107363号、および同第2002/0106730号に開示されている。

【0220】

PD-1は、PD-L1に結合するその能力に基づいて、CD28/CTLA-4ファ

50

ミリーの分子のメンバーである。in vivoでは、CTLA-4と同様に、PD-1は抗CD3に应答してT細胞の表面上に急速に誘導される(Agata et al. Int. Immunol. 8:765, 1996)。T細胞疲弊は、PD-1発現の誘導と同時である。参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第2008/083174号を参照されたい。T細胞の細胞傷害性は、T細胞を、PD-1の発現または活性を低減する作用剤と接触させることによって増加させることができる。PD-1の発現または活性を低減する作用剤を使用して、腫瘍に対する免疫応答などの免疫応答を増加させることができる。理論に束縛されることなく、PD-1発現または活性の低減により、細胞傷害性T細胞活性の増加がもたらされ、特異的な免疫応答が増加する。

#### 【0221】

PD-1ファミリーメンバーは、抗原提示細胞上のPD-L1およびPD-L2などの1つまたは複数の受容体に結合する。PD-L1の例示的なアミノ酸配列は、2000年10月4日に利用可能なおりの参照により本明細書に組み込まれるGENBANK(登録商標)受託番号AAG18508として提供される。例示的なPD-L2前駆体アミノ酸配列は、2002年4月8日に利用可能なおりの参照により本明細書に組み込まれるGENBANK(登録商標)受託番号AAK15370として提供される。例示的なバリエーションであるPD-L2前駆体アミノ酸配列は、2006年12月12日に利用可能なおりの参照により本明細書に組み込まれるGENBANK(登録商標)受託番号Q9BQ51として提供される。

#### 【0222】

本明細書に開示される方法において有用なアンタゴニストは、PDリガンド1(PD-L1)もしくはPDリガンド2(PD-L2)の発現もしくは活性を低減するまたはPD-1とPD-L1の相互作用もしくはPD-1とPD-L2の相互作用を低減する作用剤を含み、これらは、PD-アンタゴニストである。例示的な化合物としては、抗体(例えば、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、および抗PD-L2抗体)、RNAi分子(例えば、抗PD-1 RNAi分子、抗PD-L1 RNAi、および抗PD-L2 RNAi)、アンチセンス分子(例えば、抗PD-1アンチセンスRNA、抗PD-L1アンチセンスRNA、および抗PD-L2アンチセンスRNA)、ドミナントネガティブタンパク質(例えば、ドミナントネガティブPD-1タンパク質、ドミナントネガティブPD-L1タンパク質、およびドミナントネガティブPD-L2タンパク質)、ならびに小分子阻害剤が挙げられる。これらのPD-1アンタゴニストのいずれも、本明細書に開示される方法において有用である。

#### 【0223】

他の抗体も本明細書に開示される方法において有用である(例えば、抗CTLA-4抗体、および抗LAG3抗体、抗TIM-3抗体または抗BTLA抗体)、RNAi分子(例えば、抗CTLA-4 RNAi分子、抗LAG3 RNAi、抗TIM-3 RNAiおよび抗BTLA RNAi)、アンチセンス分子(例えば、抗CTLA-4アンチセンスRNA、抗LAG3アンチセンスRNA、抗TIM-3アンチセンスRNAおよび抗BTLAアンチセンスRNA)。同じく有用なドミナントネガティブタンパク質は、ドミナントネガティブCTLA-4タンパク質、ドミナントネガティブLAG3タンパク質、ドミナントネガティブLAG-3タンパク質およびドミナントネガティブBTLAタンパク質である。これらのアンタゴニストのいずれも、本明細書に開示される方法において有用である。さらに、4-1BBに結合する抗体およびRNAアプタマーなどの4-1BBアゴニストが本明細書に開示される方法において有用である。TGF- $\beta$ 受容体阻害タンパク質またはドミナントネガティブタンパク質も有用である。

#### 【0224】

アンタゴニストは、細胞における標的の発現または活性を低減する能力を有する作用剤である。一部の実施形態では、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、TIM-3、CTLA-4またはBTLA発現または活性が、対照におけるそのような発現または活性と比較して少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%

10

20

30

40

50

、80%、90%、または100%低減する。例示的な活性の低減は、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または検出可能な活性が完全に存在しないことである。一実施例では、対照は、PD-1アンタゴニストで処理されていない細胞である。別の例では、対照は、標準値、または活性に影響を及ぼさないことが分かっている担体などの作用剤と接触させた細胞である。発現または活性は、当技術分野における任意の標準方法によって決定することができる。1つの非限定的な例では、PD-1アンタゴニストにより、PD-1のPD-L1、PD-L2、またはその両方への結合が阻害されるまたは低減する。1つの非限定的な例では、PD-L1アンタゴニストにより、PD-L1またはPD-1の結合が低減する。

10

#### 【0225】

アゴニストは、細胞における標的の発現または活性を増加させる能力を有する作用剤である。一部の実施形態では、4-1BB発現または活性が対照におけるそのような発現または活性と比較して少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%増加する。例示的な活性の増加は、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または検出可能な活性が完全に存在しないことである。一実施例では、対照は、4-1BBアゴニストで処理されていない細胞である。別の例では、対照は、標準値、または活性に影響を及ぼさないことが分かっている担体などの作用剤と接触させた細胞である。発現または活性は、当技術分野における任意の標準方法によって決定することができる。1つの非限定的な例では、4-1BBアゴニストにより、結合が刺激されるまたは増加する。

20

#### A. 抗体

#### 【0226】

一部の実施形態では、アンタゴニストは、抗体である。PD-1に結合する抗体の例示的なアミノ酸配列は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2006/0210567号において開示されている。PD-1に結合する抗体は、同じく参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2006/0034826号にも開示されている。PD-1に結合する抗体は、米国特許第7,488,802号、米国特許第7,521,051号、米国特許第8,008,449号、米国特許第8,354,509号、米国特許第8,168,757号、およびPCT公開WO2004/004771号、PCT公開WO2004/072286号、PCT公開WO2004/056875号、および米国特許出願公開第2011/0271358号にも開示されている。抗体は、KEYTRUDA（登録商標）（ペムプロリズマブ）であってよい。抗体は、ニボルマブ（ONO-4538/BMS-936558）またはOno PharmaceuticalsからのOPDIVO（登録商標）などの抗PD-1抗体であってよい。PD-L1結合性アンタゴニストとしては、YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105およびMEDI 4736が挙げられる。米国特許出願公開第2017/0044256号を参照されたい。ヒトPD-L1に特異的に結合するものであり、本開示の方法および組成物において有用であるモノクローナル抗体の例は、PCT公開WO2013/019906号、PCT公開WO2010/077634号A1および米国特許第8,383,796号に開示されている。PD-1に対するチェックポイント阻害剤抗体（例えば、ニボルマブ、ピジリズマブ、およびペムプロリズマブ）またはPD-L1に対するチェックポイント阻害剤抗体（例えば、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、およびアベルマブ）は、本明細書に開示される方法のいずれにおいても有用である。PD-1、PD-L2およびPD-1に結合する抗体は、特許第8,552,154号にも開示されている。いくつかの実施例では、抗体は、CTLA-4、BTLA、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、例えば、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8 M^{-1}$ または少なくとも $10^9 M^{-1}$ などの親和定数で特異的に結合する。これらの抗体および抗原結合性断片はいずれも本明細書に開示される方法にお

30

40

50

いて有用である。

【0227】

CTLA-4に特異的に結合する例示的な抗体は、PCT公開WO2001/014424号、PCT公開WO2004/035607号、米国特許出願公開第2005/0201994号、欧州特許第EP1141028号、および欧州特許第EP1212422B1号に開示されている。追加的なCTLA-4抗体は、米国特許第5,811,097号、米国特許第5,855,887号、米国特許第6,051,227号、米国特許第6,984,720号、米国特許第6,682,736号、米国特許第6,207,156号、米国特許第5,977,318号、米国特許第6,682,736号、米国特許第7,109,003号、米国特許第7,132,281号、米国特許第7,452,535号、および米国特許第7,605,238号；PCT公開WO01/14424号、PCT公開WO00/37504号、PCT公開WO98/42752号、米国特許出願公開第2000/037504号、米国特許出願公開第2002/0039581号、および米国特許出願公開第2002/086014号に開示されている。CTLA-4に特異的に結合する抗体は、Hurwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17):10067-10071 (1998); Camacho et al., J. Clin. Oncol., 22(145): Abstract No. 2505 (2004) (antibody CP-675206); Mokyr et al., Cancer Res., 58:5301-5304 (1998)にも開示されている。一部の実施形態では、CTLA-4アンタゴニストは、イピリムマブ (Ipilimumab) (MDX-010およびMDX-101およびYERVOY (登録商標)としても公知)であり、参照により本明細書に組み込まれるPCT公開WO2001/014424号を参照されたい。これらの抗体および抗原結合性断片は、本明細書に開示される方法において有用である。

10

20

30

40

50

【0228】

さらなる実施形態では、BTLAアンタゴニストを本明細書に開示される方法において利用する。BTLAに特異的に結合する抗体は、例えば、全て参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2016/0222114号、米国特許出願公開第2015/0147344号、および米国特許出願公開第2012/0288500号において開示されている。BTLA活性をモジュレートする生物学的作用物質 (biological agent)、特にヘルペスウイルス侵入メディエーター (HVEV) シス複合体を使用するものが、どちらも参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2014/0220051号および米国特許出願公開第2010/0104559号に開示されている。さらに他の実施形態では、抗体は、TSR-022などのTIM-3に特異的に結合する。さらなる実施形態では、抗体は、BMS-986016、GSK2831781、または、参照により本明細書に組み込まれるPCT公開WO2015042246号A1に開示されている抗体などの、LAG3に特異的に結合する。インターネットでclinicaltrials.govにおいて利用可能であり、参照により本明細書に組み込まれる "Safety Study of Anti-LAG-3 With and Without Anti-PD-1 in the Treatment of Solid Tumors" に関して治験番号NCT01968109も参照されたい。これらの抗体および抗原結合性断片は、本明細書に開示される方法において有用である。

【0229】

4-1BBアゴニスト抗体も有用である。適切な抗体は、例えば、どちらも参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,337,850号およびPCT公開WO2015179236号A1において開示されている。開示されている方法のいずれかにおいて有用な抗体として、ウレルマブ (BMS-663513) およびPF-05082566 (Pfizer) が挙げられる。

【0230】

開示されている方法において有用な抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、脱免疫抗体 (例えば、ヒト-抗マウス応答を低減するため)、キメラ抗体、および免疫グロブリン (Ig) 融合タンパク質を含む。これらの抗体の抗原結合性断片も本明細書に開示される方法において有用である。ポリクローナル抗体は、適切な対象 (例えば、獣医学的对象

）を免疫原で免疫することによってなどで当業者が調製することができる。免疫された対象における抗体価を、固定した抗原を使用した酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A）を用いてなど、標準の技法によって経時的にモニタリングすることができる。一実施例では、C T L A - 4、B T L A、T I M - 3、L A G 3、P D - 1、P D - L 1、またはP D - L 2（またはこれらの組合せ）に特異的に結合する抗体を哺乳動物（例えば、血清から）から単離し、当業者に公知の技法によってさらに精製することができる。例えば、抗体を、プロテインAクロマトグラフィーを使用して精製して、I g G抗体を単離することができる。

#### 【0231】

抗体産生細胞を対象から得、標準の技法によってモノクローナル抗体を調製するために使用することができる（Kohler and Milstein Nature 256:495 49, 1995; Brown et al., J. Immunol. 127:539 46, 1981; Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 96, 1985; Gefter, M. L. et al. (1977) Somatic Cell Genet. 3:231 36; Kenneth, R. H. in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses. Plenum Publishing Corp., New York, N.Y. (1980); Kozbor et al. Immunol. Today 4:72, 1983; Lerner, E. A. (1981) Yale J. Biol. Med. 54:387 402; Yeh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76:2927 31, 1976)。一実施例では、不死細胞株（一般には骨髄腫）とP D - 1、P D - L 1、P D - L 2、T I M - 3、L A G 3、B T L AまたはC T L A - 4を用いて免疫した哺乳動物由来のリンパ球（一般には脾細胞）とを融合し、得られたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングして、目的のポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定する。

#### 【0232】

一実施形態では、ハイブリドーマを作製するために、不死細胞株（例えば、骨髄腫細胞株）をリンパ球と同じ哺乳動物種から得る。例えば、マウスハイブリドーマを、C T L A - 4、B T L A、T I M - 3、L A G 3、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2、または4 - 1 B Bペプチドを用いて免疫したマウス由来のリンパ球を不死化マウス細胞株と融合することによって作製することができる。一実施例では、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養培地（「H A T培地」）に対して感受性であるマウス骨髄腫細胞株を利用する。例えば、P 3 - N S 1 / 1 - A g 4 - 1、P 3 - x 6 3 - A g 8 . 6 5 3またはS p 2 / O - A g 1 4骨髄腫株を含めたいくつもの骨髄腫細胞株のいずれかを標準の技法に従って融合パートナーとして使用することができ、これらは、A m e r i c a n Type Culture Collection (A T C C)、R o c k v i l l e、M dから入手可能である。H A T感受性マウス骨髄腫細胞とマウス脾細胞を、ポリエチレングリコール（「P E G」）を使用して融合することができる。次いで、融合の結果生じたハイブリドーマ細胞を、融合していない（および無効に融合した）骨髄腫細胞を死滅させるH A T培地を使用して選択する。目的のモノクローナル抗体を産生させるハイブリドーマ細胞を、例えば、免疫学的アッセイ（例えば、酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A）またはラジオイムノアッセイ（R I A））を使用することによってハイブリドーマ培養上清をP D - 1、P D - L 1、T I M - 3、L A G 3、B T L A、C T L A - 4、P D - L 2または4 - 1 B B分子に結合する抗体の産生についてスクリーニングすることによって検出することができる。

#### 【0233】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製することの代替として、組換えコンピナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）を、C T L A - 4、B T L A、T I M - 3、L A G 3、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2または4 - 1 B Bを用いてスクリーニングして、ポリペプチドに特異的に結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離することにより、C T L A - 4、B T L A、T I M - 3、L A G 3、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2または4 - 1 B Bに特異

的に結合するモノクローナル抗体を同定し、単離することができる。ファージディスプレイライブラリーを生成し、スクリーニングするためのキットが市販されている（例えば、これだけに限定されないが、PharmaciaおよびStratagene）。抗体ディスプレイライブラリーの生成およびスクリーニングの使用に特に適している方法および試薬の例は、例えば、米国特許第5,223,409号；PCT公開WO90/02809号；PCT公開WO91/17271号；PCT公開WO92/18619号；PCT公開WO92/20791号；PCT公開WO92/15679号；PCT公開WO92/01047号；PCT公開WO93/01288号；PCT公開WO92/09690号；Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982, 1991；Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 19:4133-4137, 1991に見いだすことができる。

10

#### 【0234】

一実施例では、各CDRの特異性決定領域の配列を決定する。SDR（非リガンド接触部位）の外側の残基を置換する。例えば、上記の表中のCDR配列のいずれかにおいて、多くて1アミノ酸、2アミノ酸または3アミノ酸を置換することができる。1つの抗体由来のフレームワーク領域および異なる抗体由来のCDRを含むキメラ抗体の産生は当技術分野において周知である。例えば、ヒト化抗体を常套的に産生することができる。抗体または抗体断片は、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、または4-1BBに結合するドナーモノクローナル抗体由来の相補性決定領域（CDR）と、ヒトアクセプター免疫グロブリン重鎖および軽鎖フレームワーク由来の免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域フレームワークとを有するヒト化免疫グロブリンであってよい。ヒト化モノクローナル抗体は、ドナーマウス免疫グロブリン（CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2または4-1BB特異的抗体など）の可変重鎖および可変軽鎖由来のドナー相補性決定領域（CDR）をヒト可変ドメインに移入し、次いで、親和性を保持するために必要であればフレームワーク領域内のヒト残基を置換することによって産生させることができる。ヒト化モノクローナル抗体に由来する抗体成分を使用することにより、ドナー抗体の定常領域の免疫原性に関連する潜在的な問題が未然に防がれる。ヒト化モノクローナル抗体を産生させるための技法は、例えば、Jones et al., Nature 321:522, 1986；Riechmann et al., Nature 332:323, 1988；Verhoeyen et al., Science 239:1534, 1988；Cartier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285, 1992；Sandhu, Crit. Rev. Biotech.12:437, 1992；およびSinger et al., J. Immunol.150:2844, 1993によって記載されている。抗体は、任意のアイソタイプのものであってよいが、いくつかの実施形態では、抗体は、これだけに限定されないが、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>およびIgG<sub>4</sub>を含めたIgGである。一部の実施形態では、ヒト化免疫グロブリンは、目的の抗原（例えば、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、または4-1BB）に、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、例えば、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8 M^{-1}$ または少なくとも $10^9 M^{-1}$ の親和定数で特異的に結合する。

20

30

#### 【0235】

一実施形態では、ヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列は、ドナー免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列と少なくとも約65%同一であり得る。したがって、ヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列は、ドナー免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列と少なくとも約75%、少なくとも約85%、少なくとも約99%または少なくとも約95%同一であり得る。ヒトフレームワーク領域、およびヒト化抗体フレームワーク領域においてなされ得る変異は当技術分野で公知である（例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,585,089号を参照されたい）。

40

#### 【0236】

マウスモノクローナル抗体、キメラ抗体、およびヒト化抗体などの抗体は、全長分子、

50

ならびに、重鎖および軽鎖可変領域を含み、特異的なエピトープ決定基に結合することができる、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、およびF vなどのその断片を含む。これらの抗体断片は、それらの抗原または受容体を選択的に結合するいくらかの能力を保持する。これらの断片としては、

( 1 ) F a b、抗体分子の一価抗原結合性断片を含有する断片であり、抗体全体を酵素パパイニンで消化して、インタクトな軽鎖および1つの重鎖の一部をもたらすことによって作製することができる；

( 2 ) F a b '、抗体全体をペプシンで処理し、その後、還元してインタクトな軽鎖および重鎖の一部をもたらすことによって得ることができる抗体分子の断片；抗体分子当たり2つのF a b '断片が得られる；

( 3 ) ( F a b ' )<sub>2</sub>、抗体全体を酵素ペプシンで処理し、その後の還元を行わないことによって得ることができる抗体の断片；F ( a b ' )<sub>2</sub>は、2つのジスルフィド結合によって保持される2つのF a b '断片の二量体である；

( 4 ) F v、2本の鎖として発現される軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された断片；ならびに

( 5 ) 単鎖抗体（例えば、s c F v）、遺伝的に融合した単鎖分子として、適切なポリペプチドリンカーによって連結された軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された分子と定義される

が挙げられる。

#### 【 0 2 3 7 】

これらの抗原結合性断片を作製する方法は、当技術分野で公知である（例えば、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988を参照されたい）。いくつかの実施例では、可変領域は、個々のポリペプチドとして発現される軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む。F v抗体は、一般には、約25 k D aであり、各重鎖および各軽鎖当たり3つのC D Rを有する完全な抗原結合性部位を含有する。これらの抗体を作製するために、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>を宿主細胞において2つの個々の核酸構築物から発現させることができる。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>が隣接せずに発現される場合、F v抗体の鎖は、一般には、非共有結合性の相互作用によって保持される。しかし、これらの鎖は、希釈されると解離する傾向があり、したがって、鎖をグルタルアルデヒド、分子間ジスルフィド、またはペプチドリンカーによって架橋結合させるための方法が開発されている。したがって、一実施例では、F vは、重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合によって化学的に連結したジスルフィド安定化F v ( d s F v ) であり得る。

#### 【 0 2 3 8 】

追加的な実施例では、F v断片は、ペプチドリンカーによって接続されたV<sub>H</sub>鎖およびV<sub>L</sub>鎖を含む。これらの単鎖抗原結合性タンパク質 ( s c F v ) は、オリゴヌクレオチドによって接続されたV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインをコードするD N A配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。構造遺伝子を発現ベクターに挿入し、それをその後、E . c o l iなどの宿主細胞に導入する。組換え宿主細胞は、2つのVドメインを架橋結合させるリンカーペプチドを有する単一のポリペプチド鎖を合成する。s c F vを作製するための方法は当技術分野で公知である ( Whitlow et al., *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, page 97, 1991 ; Bird et al., *Science* 242:423, 1988 ; 米国特許第4, 946, 778号 ; Pack et al., *Bio/Technology* 11:1271, 1993 ; およびSandhu, 上掲を参照されたい ) 。

#### 【 0 2 3 9 】

抗体断片を、抗体のタンパク質分解性加水分解によって、または断片をコードするD N AをE . c o l iにおいて発現させることによって調製することができる。抗体断片を、抗体全体を従来の方法によってペプシンまたはパパイニン消化することにより得ることができる。例えば、抗体断片を、抗体をペプシンで酵素的切断して、F ( a b ' )<sub>2</sub>で表される5 S断片をもたらすことによって作製することができる。この断片を、チオール還元剤

10

20

30

40

50

、および必要に応じてジスルフィド連結の切断から生じるスルフヒドリル基のブロック基を用いてさらに切断して、3 . 5 S F a b ' 一価断片を作製することができる。あるいは、ペプシンを使用した酵素的切断により、一価 F a b ' 断片2つと F c 断片が直接生じる(米国特許第4, 036, 945号および米国特許第4, 331, 647号、およびその中に含有される参考文献; Nisonhoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman et al., Methods in Enzymology, Vol. 1, page 422, Academic Press, 1967; および Coligan et al. at sections 2.8.1-2.8.10 and 2.10.1-2.10.4を参照されたい)。

#### 【0240】

重鎖を分離して一価の軽鎖 - 重鎖断片を形成すること、断片をさらに切断すること、または他の酵素的、化学的、もしくは遺伝学的技法などの、抗体を切断する他の方法も、断片がインタクトな抗体によって認識される抗原に結合する限りは使用することができる。

10

#### 【0241】

抗体の保存的バリエーションを作製することができることが当業者には理解されよう。d s F v 断片または s c F v 断片におけるなどの抗体断片に使用されるそのような保存的バリエーションは、V<sub>H</sub> 領域と V<sub>L</sub> 領域の間の正しいフォールディングおよび安定化に必要なアミノ酸残基を保持し、また、分子の低 p I および低毒性を保存するために残基の電荷特性を保持する。V<sub>H</sub> 領域および V<sub>L</sub> 領域にアミノ酸置換(例えば、多くて1アミノ酸、多くて2アミノ酸、多くて3アミノ酸、多くて4アミノ酸、または多くて5アミノ酸の置換)を作製して、収量を増加させることができる。したがって、当業者は、目的の抗体のアミノ酸配列を容易に見直し、アミノ酸の1つまたは複数を上記の簡単な表でつきとめ、保存的置換を同定し、周知の分子技法を使用して保存的バリエーションを作製することができる。

20

#### 【0242】

治療用部分、診断用部分、または検出用部分などのエフェクター分子を、C T L A - 4、B T L A、T I M - 3、L A G 3、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2、または4 - 1 B B に特異的に結合する抗体を、当業者に公知の任意の数の手段を使用して連結することができる。共有結合性の付着による手段および非共有結合性の付着による手段のどちらも使用することができる。抗体にエフェクター分子を結合させるための手順は、エフェクターの化学構造に応じて変動する。ポリペプチドは、一般には、エフェクター分子の結合をもたらすための抗体上の適切な官能基との反応に利用可能である種々の官能基; 例えば、カルボン酸(C O O H)、遊離アミン(- N H<sub>2</sub>)またはスルフヒドリル(- S H)基を含有する。あるいは、抗体を誘導体化して、追加的な反応性官能基を露出または結合させる。誘導体化は、P i e r c e C h e m i c a l C o m p a n y、R o c k f o r d、I L から入手可能なものなどのいくつかのリンカー分子のいずれかの結合を伴い得る。リンカーは、抗体とエフェクター分子を結合するために使用される任意の分子であってよい。リンカーは、抗体とエフェクター分子の両方に共有結合を形成することができる。適切なリンカーは当業者には周知であり、それらとしては、これだけに限定されないが、直鎖または分枝鎖炭素リンカー、複素環式炭素リンカー、またはペプチドリリンカーが挙げられる。抗体およびエフェクター分子がポリペプチドである場合、リンカーを構成成分のアミノ酸にそれらの側鎖を通じて(例えば、システインにジスルフィド連結を通じて)または末端アミノ酸のアルファ炭素アミノおよびカルボキシル基に結合することができる。

30

40

#### 【0243】

抗体をコードする核酸配列を、例えば、適切な配列のクローニング、または、Narang et al., Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979のホスホトリエステル法; Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979のホスホジエステル法; Beaucage et al., Tetra. Lett. 22:1859-1862, 1981のジエチルホスホロアミダイト法; 例えば、例えば N e e d h a m - V a n D e v a n t e r et al., Nucl. Acids Res. 12:6159-6168, 1984に記載されている自動合成機を使用する、Beaucage & Caruthers, Tetra. Letts. 22(20):1859-1862, 1981によって記載されている固相ホスホロアミダイトトリエステル法; および米国特許第4, 458, 066号の固体支持体法などの方法による直接化学合成によるもの

50

を含めた任意の適切な方法によって調製することができる。化学合成により、一本鎖オリゴヌクレオチドが生じる。これを、相補配列とのハイブリダイゼーションによって、または一本鎖を鋳型として使用したDNAポリメラーゼを用いた重合によって二本鎖DNAに変換することができる。DNAの化学合成は一般に約100塩基の配列に限定されるが、短い配列をライゲーションすることによってより長い配列を得ることができることが当業者には理解されよう。

#### 【0244】

CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、または4-1BBに特異的に結合する抗体をコードする例示的な核酸コード配列をクローニング技法によって調製することができる。適切なクローニングおよび配列決定技法の例、および当業者を多くのクローニング訓練に導く十分な指示はSambrook et al., 上掲、Berger and Kimmel (eds.), 上掲、およびAusubel, 上掲において見いだされる。生物学的試薬および実験機器の製造者による製品情報によっても有用な情報もたらされる。そのような製造者としては、SIGMA Chemical Company (Saint Louis, MO)、R&D Systems (Minneapolis, MN)、Pharmacia Amersham (Piscataway, NJ)、CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA)、Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)、Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD)、Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)、Invitrogen (San Diego, CA)、およびApplied Biosystems (Foster City, CA)、ならびに当業者に公知の多くの他の商業的供給源が挙げられる。

10

20

#### 【0245】

核酸は、増幅法によって調製することもできる。増幅法としては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、転写に基づく増幅系(TAS)、自家持続配列複製系(3SR)が挙げられる。多種多様なクローニング方法、宿主細胞、およびin vitro増幅法体系は当業者には周知である。

30

#### 【0246】

一実施例では、有用な抗体は、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、または4-1BBに特異的に結合する抗体由来の可変領域をコードするcDNAを、エフェクター分子(EM)をコードするcDNAを含むベクターに挿入することによって調製される。挿入は、可変領域とEMがインフレームで読み取られるようになされ、したがって、1つの連続的なポリペプチドが作製される。したがって、コードされるポリペプチドは、機能的なFv領域および機能的なEM領域を含有する。一実施形態では、検出可能なマーカー(例えば、酵素)をコードするcDNAをscFvに、マーカーがscFvのカルボキシル末端に位置するようにライゲーションする。別の例では、検出可能なマーカーはscFvのアミノ末端に位置する。別の実施例では、検出可能なマーカーをコードするcDNAを、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、または4-1BBに特異的に結合する抗体の重鎖可変領域に、マーカーが重鎖可変領域のカルボキシル末端に位置するようにライゲーションする。その後、重鎖-可変領域をCTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、または4-1BBに特異的に結合する抗体の軽鎖可変領域にジスルフィド結合を使用してライゲーションすることができる。さらに別の実施例では、マーカーをコードするcDNAを、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、または4-1BBに結合する抗体の軽鎖可変領域に、マーカーが軽鎖可変領域のカルボキシル末端に位置するようにライゲーションする。その後、軽鎖-可変領域をCTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、P

40

50

D - 1、PD - L 1、PD - L 2、または 4 - 1 B B に特異的に結合する抗体の重鎖可変領域にジスルフィド結合を使用してライゲーションすることができる。

【0247】

抗体またはその機能性断片をコードする核酸を単離し、クローニングしたら、タンパク質を細菌、植物、酵母、昆虫および哺乳動物細胞などの組換え操作された細胞において発現させることができる。適切な宿主細胞にDNAを移入することにより、抗体またはその機能性断片をコードする1つまたは複数のDNA配列を*in vitro*において発現させることができる。細胞は、原核細胞であっても真核細胞であってもよい。この用語は、主題の宿主細胞の任意の後代も含む。複製中に変異が生じ得るので、全ての後代が親細胞と同一でない可能性があることが理解される。安定な移入、つまり、外来DNAを宿主において継続的に維持する方法は、当技術分野で公知である。

10

【0248】

抗体またはその機能性断片をコードするポリヌクレオチド配列を発現制御配列に作動的に連結することができる。コード配列に作動的に連結した発現制御配列を、発現制御配列と適合する条件下でコード配列の発現が実現されるようにライゲーションする。発現制御配列としては、これだけに限定されないが、適切なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、タンパク質をコードする遺伝子の前の開始コドン(すなわち、ATG)、イントロンのスプライシングシグナル、mRNAの適切な翻訳を可能にするためのその遺伝子の正しい読み枠の維持、および終止コドンが挙げられる。

20

【0249】

抗体またはその機能性断片をコードするポリヌクレオチド配列を、これだけに限定されないが、配列の挿入または組み入れが可能になるように操作することができ、原核生物または真核生物のいずれかにおいて発現させることができるプラスミド、ウイルスまたは他のビヒクルを含めた発現ベクターに挿入することができる。宿主としては、微生物、酵母、昆虫および哺乳動物生物体を挙げることができる。真核生物の配列またはウイルスの配列を有するDNA配列を原核生物において発現させる方法は当技術分野で周知である。宿主において発現および複製することができる生物学的に機能的なウイルスおよびプラスミドDNAベクターは、当技術分野で公知である。

【0250】

組換えDNAを用いた宿主細胞の形質転換は、当業者に周知の従来技法によって行うことができる。宿主が*E. coli*などの原核生物である場合、DNAを取り込むことができるコンピテント細胞を、指数関数成長期後に収集し、その後、当技術分野で周知の手順を使用してCaCl<sub>2</sub>法によって処理した細胞から調製することができる。あるいは、MgCl<sub>2</sub>またはRbClを使用することができる。所望であれば宿主細胞のプロトプラストの形成後に、またはエレクトロポレーションにより、形質転換を実施することもできる。

30

【0251】

宿主が真核生物である場合、リン酸カルシウム共沈、微量注射、エレクトロポレーションなどの従来機械的な手順、リボソームに包まれたプラスミドの挿入、またはウイルスベクターなどのDNAのトランスフェクションの方法を使用することができる。真核細胞を抗体またはその機能性断片(antibody of functional fragment thereof)をコードするポリヌクレオチド配列および単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子などの選択可能な表現型をコードする第2の外來DNA分子で共形質転換することもできる。別の方法は、シミアンウイルス40(SV40)またはウシパピローマウイルスなどの真核生物ウイルスベクターを使用して、真核細胞を一過性に感染させるまたは形質転換し、タンパク質を発現させることである(例えば、Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982を参照されたい)。当業者は、有用なプラスミドおよびベクターなどの発現系をCOS、CHO、HeLaおよび骨髓腫細胞株などの高等真核細胞を含めた細胞におけるタンパク質の産生に容易に使用することができる。

40

【0252】

50

組換えによって発現させたポリペプチドの単離および精製を分取クロマトグラフィーおよび免疫学的分離を含めた従来の手段によって行うことができる。組換え抗体を発現させたら、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィーなどを含めた当技術分野の標準の手順に従って精製することができる（一般に、R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y., 1982を参照されたい）。少なくとも約90～95%均質性である実質的に純粋な組成物が本明細書に開示され、98～99%またはそれよりも大きな均質性を有する組成物を製薬目的で使用することができる。治療的に使用する場合、部分的にまたは所望の均質性まで精製されたら、ポリペプチドは内毒素を実質的に含まないはずである。

#### 【0253】

*E. coli*などの細菌由来の単鎖抗体を含めた単鎖抗体を発現させ、かつ/または適切な活性形態までリフォールディングさせるための方法が記載されており、周知であり、本明細書に開示される抗体に適用可能である。全て参照により本明細書に組み込まれるBuchner et al., *Anal. Biochem.* 205:263-270, 1992; Pluckthun, *Biotechnology* 9:545, 1991; Huse et al., *Science* 246:1275, 1989およびWard et al., *Nature* 341:544, 1989を参照されたい。

#### 【0254】

多くの場合、*E. coli*または他の細菌由来の機能的な異種タンパク質は封入体から単離され、強力な変性剤を使用した可溶化、およびその後のリフォールディングが必要である。可溶化ステップの間には、当技術分野で周知の通り、ジスルフィド結合を分離するために還元剤が存在しなければならない。還元剤を伴う例示的な緩衝液は、0.1MのTris、pH8、6Mのグアニジン、2mMのEDTA、0.3MのDTE（ジチオエリトリトール）である。ジスルフィド結合の再酸化は、参照により本明細書に組み込まれるSaxena et al., *Biochemistry* 9: 5015-5021, 1970に記載されている通り、特に、Buchner et al., 上掲に記載されている通り、還元型および酸化型の低分子量チオール試薬の存在下で行うことができる。

#### 【0255】

再生は、一般には、変性し、還元されたタンパク質をリフォールディング緩衝液中に希釈（例えば、100倍）することによって実現される。例示的な緩衝液は、0.1MのTris、pH8.0、0.5MのL-アルギニン、8mMの酸化型グルタチオン（GSSG）、および2mMのEDTAである。

#### 【0256】

2鎖抗体精製プロトコールに対する改変として、重鎖および軽鎖領域を別々に可溶化し、還元し、次いで、リフォールディング溶液中で組み合わせる。例示的な収量は、これらの2つのタンパク質を、一方のタンパク質の他方のタンパク質に対するモル過剰が5倍を超えないようなモル比で混合した場合に得られる。酸化還元-シャッフリングが完了した後、過剰な酸化型グルタチオンまたは他の酸化性低分子量化合物をリフォールディング溶液に添加することが望ましい。

#### 【0257】

組換え方法に加えて、本明細書に開示される抗体およびその機能性断片も、標準のペプチド合成を使用して全体的にまたは部分的に構築することができる。約50アミノ酸未満の長さのポリペプチドの固相合成は、配列のC末端アミノ酸を不溶性支持体に結合させ、その後、配列内の残りのアミノ酸を逐次的に付加することによって実現することができる。固相合成のための技法は、Barany & Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis, Part A*. pp. 3-284; Merrifield et al., *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2156, 1963、およびStewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., 1984に記載されている。短い断片のアミノ末端およびカルボキシル末端の縮合によってより長いタンパク質を合成することもできる。カルボキシル末端の活性化によって（例えば、カップリング試薬N, N'-ジシクロヘキシルカルボ

10

20

30

40

50

ジイミド (N, N'-dicyclohexylcarbodiimide) を使用することによって) ペプチド結合を形成する方法は当技術分野で周知である。

#### B. 阻害核酸

##### 【0258】

CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2の発現および/または活性を低減する阻害核酸を本明細書に開示される方法において使用することもできる。一実施形態は、標的遺伝子の発現に干渉するまたはそれを阻害するための低分子阻害RNA (siRNA) である。PD-1、PD-L1およびPD-L2をコードする核酸配列は、全て参照により組み込まれる2017年4月28日に入手可能な、GENBANK (登録商標) 受託番号NM\_\_005018、AF344424、NP\_\_079515、およびNP\_\_054862に開示されている。

10

##### 【0259】

一般に、siRNAは、比較的長い二本鎖RNA分子のダイサーまたはDCL酵素による切断によって生成される (Zamore, Science, 296:1265-1269, 2002; Bernstein et al., Nature, 409:363-366, 2001)。動物および植物では、siRNAはRISC中にアセンブリされ、RISCの配列特異的リボ核酸分解活性 (ribonucleolytic activity) をガイドし、それにより、細胞質におけるmRNAまたは他のRNA標的分子の切断がもたらされる。核において、siRNAによりヘテロクロマチン関連ヒストンおよびDNAメチル化もガイドされ、それにより、個々の遺伝子または大きなクロマチドメインの転写サイレンシングがもたらされる。PD-1 siRNAは、Santa Cruz Biotechnology, Incなどから市販されている。

20

##### 【0260】

本開示は、標的遺伝子の発現の干渉または阻害に適したRNAであって、各鎖上に0~5ヌクレオチドの3'および/または5'突出部を含有する約15~約40ヌクレオチドの二本鎖RNAを含むRNAを提供する。RNAの配列は、発現の干渉または阻害が望まれるCTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2などの標的遺伝子のmRNAまたは転写物の一部と実質的に同一である。本開示の目的に関して、発現の干渉または阻害が望まれる標的遺伝子のmRNAまたは転写物の特定の一部と「実質的に同一の」RNAの配列は約30パーセント以下が異なり、一部の実施形態では、標的遺伝子のmRNAまたは転写物の特定の一部と約10パーセント以下が異なる。特定の実施形態では、RNAの配列は、標的遺伝子のmRNAまたは転写物の特定の一部と正確に同一である。

30

##### 【0261】

したがって、本明細書に開示されるsiRNAは、約15~約40ヌクレオチドの長さの二本鎖RNAおよび各鎖上の0~5ヌクレオチドの長さを有する3'または5'突出部を含み、ここで、二本鎖RNAの配列は、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2をコードする核酸のmRNAまたは転写物の一部と実質的に同一である (上記を参照されたい)。特定の実施例では、二本鎖RNAは、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2をコードする核酸と実質的に同一である約19~約25ヌクレオチド、例えば、20ヌクレオチド、21ヌクレオチド、または22ヌクレオチドを含有する。さらなる実施例では、二本鎖RNAは、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2をコードする核酸と100%同一である約19~約25ヌクレオチドを含有する。この文脈において、「約」は、整数量だけを指すものではないはずである。一実施例では、「約」20ヌクレオチドは、19~21ヌクレオチドの長さのヌクレオチドを指す。

40

##### 【0262】

二本鎖RNA上の突出部に関しては、1つの突出部の長さは他の鎖の突出部の長さに依存しないので、突出部の長さは2つの鎖間で独立している。特定の実施例では、3'また

50

は 5' 突出部の長さは、少なくとも 1 つの鎖において 0 ヌクレオチドであり、一部の  
 場合は、両方の鎖において 0 ヌクレオチドである（したがって、平滑 dsRNA）。他の例  
 では、3' または 5' 突出部の長さは、少なくとも一方の鎖において 1 ヌクレオチド ~ 5  
 ヌクレオチドである。より詳細には、一部の実施例では、3' または 5' 突出部の長さは、  
 少なくとも一方の鎖において 2 ヌクレオチドである、または両方の鎖において 2 ヌクレ  
 オチドである。特定の実施例では、dsRNA 分子は、両方の鎖において 2 ヌクレオチド  
 の 3' 突出部を有する。

#### 【0263】

したがって、1 つの特定の提供される RNA 実施形態では、二本鎖 RNA は、20 ヌク  
 レオチド、21 ヌクレオチド、または 22 ヌクレオチドを含有し、3' 突出部の長さは、  
 両方の鎖において 2 ヌクレオチドである。本明細書に提示される RNA の実施形態では、  
 二本鎖 RNA は、約 40 ~ 60 % アデニン + ウラシル (AU) および約 60 ~ 40 % グア  
 ニン + シトシン (GC) を含有する。より詳細には、特定の実施例では、二本鎖 RNA は  
 、AU を約 50 % および GC を約 50 % 含有する。

10

#### 【0264】

本明細書には、例えば二本鎖 RNA のセンス鎖に少なくとも 1 つの修飾されたりボヌク  
 レオチドをさらに含む RNA も記載されている。特定の実施例では、修飾されたりボヌク  
 レオチドは、少なくとも 1 つの鎖の 3' 突出部、より具体的にはセンス鎖の 3' 突出部に  
 ある。修飾されたりボヌクレオチドの例は、検出可能な標識（例えば、ローダミンまたは  
 FITC などのフルオロフォア）を含むリボヌクレオチド、チオホスフェートヌクレオチ  
 ド類似体、デオキシヌクレオチド（基本分子がリボ核酸であるので、修飾体とみなされる  
 ）、2'-フルオロウラシル、2'-アミノウラシル、2'-アミノシチジン、4-チオ  
 ウラシル、5-プロモウラシル、5-ヨードウラシル、5-(3-アミノアリル)-ウラ  
 シル、イノシン、または 2'-O-Me ヌクレオチド類似体を含むことが特に意図されてい  
 る。

20

#### 【0265】

CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、または PD  
 -L2 のアンチセンスおよびリボザイム分子も本明細書に開示される方法において有用で  
 ある。アンチセンス核酸は、特定の mRNA 分子の少なくとも一部分と相補的な DNA 分  
 子または RNA 分子である (Weintraub, Scientific American 262:40, 1990)。細  
 胞において、アンチセンス核酸は対応する mRNA とハイブリダイズし、二本鎖分子を形  
 成する。細胞は二本鎖である mRNA を翻訳しないので、アンチセンス核酸は mRNA の  
 翻訳に干渉する。約 15 ヌクレオチドのアンチセンスオリゴマーが好ましく、これは、当  
 該アンチセンスオリゴマーは容易に合成され、CTLA-4、BTLA、TIM-3、L  
 AG3、PD-1、PD-L1、または PD-L2 を産生する標的細胞に導入した場合に  
 大きな分子よりも問題を引き起こす可能性が低いからである。遺伝子の *in vitro*  
 翻訳を阻害するためのアンチセンス法の使用は当技術分野において周知である（例えば、  
 Marcus-Sakura, Anal. Biochem. 172:289, 1988 を参照されたい）。

30

#### 【0266】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約 5、10、15、20、25、30、  
 35、40、45 または 50 ヌクレオチドの長さであり得る。アンチセンス核酸は、当技  
 術分野で公知の手順を使用し、化学合成および酵素によるライゲーション反応を使用し  
 て構築することができる。例えば、アンチセンス核酸分子を、天然に存在するヌクレオチド  
 を使用して化学的に合成することもでき、分子の生物学的安定性が増加するように、また  
 はアンチセンス核酸とセンス核酸の間で形成される二重鎖の物理的安定性が増大増加す  
 るように設計された多様に修飾されたヌクレオチド、例えばホスホロチオエート誘導体お  
 よびアクリジン置換ヌクレオチドを使用することもできる。アンチセンス核酸を生成す  
 るために使用することができる修飾されたヌクレオチドの例としては、とりわけ、5-フル  
 オロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサ  
 ンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウ

40

50

ラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン - e , 5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ - D - ガラクトシルケオシン ( beta-D-galactosylqueosine )、イノシンが挙げられる。

【 0 2 6 7 】

転写を止めるためのオリゴヌクレオチドの使用は、ブルーマー ( bloomer ) が 2 重ヘリックス DNA の周りに巻き付き、それにより 3 本鎖ヘリックスを形成するため、三重鎖戦略として公知である。したがって、これらの三重鎖化合物を、選択された遺伝子上の独特の部位を認識するように設計することができる ( Maher, et al., Antisense Res. and Dev. 1(3):227, 1991 ; Helene, C., Anticancer Drug Design 6(6):569, 1991 )。この型の阻害オリゴヌクレオチドも本明細書に開示される方法において有用である。

10

【 0 2 6 8 】

他の一本鎖 RNA を DNA 制限エンドヌクレアーゼと類似した様式で特異的に切断する能力を有する RNA 分子であるリボザイムも有用である。これらの RNA をコードするヌクレオチド配列の修飾により、RNA 分子内の特異的なヌクレオチド配列を認識し、それを切断する分子を工学的に作製する ( engineer ) ことが可能になる ( Cech, J. Amer. Med. Assn. 260:3030, 1988 )。この手法の主要な利点は、配列特異的であるので、特定の配列を有する mRNA のみが不活化されることである。

【 0 2 6 9 】

2 種の基本的な型のリボザイム、すなわち、テトラヒメナ型 ( Hasselhoff, Nature 334:585, 1988 ) および「ハンマーヘッド」型が存在する。テトラヒメナ型リボザイムは、4 塩基の長さの配列を認識し、一方、「ハンマーヘッド」型リボザイムは、11 ~ 18 塩基の長さの塩基配列を認識する。認識配列が長いほど、当該配列が標的 mRNA 種に排他的に存在する可能性が大きくなる。したがって、特定の mRNA 種を不活化するためにはハンマーヘッド型リボザイムがテトラヒメナ型リボザイムよりも好ましく、18 塩基の認識配列がより短い認識配列よりも好ましい。

20

【 0 2 7 0 】

種々の送達系が公知であり、siRNA および他の阻害核酸分子を治療薬として投与するために使用することができる。そのような系としては、例えば、リボソーム、微小粒子、マイクロカプセル、ナノ粒子、治療用分子 ( 複数可 ) を発現することができる組換え細胞への封入 ( 例えば、Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429, 1987 を参照されたい )、レトロウイルスベクターまたは他のベクターの一部としての治療用核酸の構築などが挙げられる。

30

C . 小分子

【 0 2 7 1 】

CTLA - 4、BTLA、TIM - 3、LAG3、PD - 1、PD - L1、または PD - L2 アンタゴニスト、および 4 - 1 BB アンタゴニストは、天然物もしくは合成 ( もしくは半合成 ) 抽出物の大きなライブラリーまたは化学的ライブラリーの両方から当技術分野で公知の方法に従って同定される分子を含む。CTLA - 4、BTLA、TIM - 3、LAG3、PD - 1、PD - L1、または PD - L2 の活性の低下を検出するスクリーニング方法 ( 例えば、PD - 1、PD - L1 および PD - L2 についての細胞死の検出 ) が、活性に関して種々の供給源から化合物を同定するために有用である。4 - 1 BB 活性の増加を検出するスクリーニング方法も、そのような供給源から化合物を同定するために有用である。最初のスクリーニングは、化合物の多様なライブラリー、種々の他の化合物および化合物ライブラリーを使用して実施することができる。したがって、CTLA - 4、BTLA、TIM - 3、LAG3、PD - 1、PD - L1、または PD - L2 に結合する分子、CTLA - 4、BTLA、TIM - 3、LAG3、PD - 1、PD - L1、または PD - L2 の発現を阻害する分子、および CTLA - 4、BTLA、TIM - 3、LAG3、PD - 1、PD - L1、または PD - L2 の活性を阻害する分子を同定することができる。4 - 1 BB の発現および / または活性を増加させる分子も同定することができる。これ

40

50

らの小分子は、コンビナトリアルライブラリー、天然物ライブラリー、または他の小分子ライブラリーから同定することができる。さらに、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、およびPD-L2アンタゴニスト、および4-1BBアゴニストを化合物として商業的供給源ならびに市販の同定された阻害剤の類似体から同定することができる。一部の実施形態では、小分子は、900ダルトン未満、または800ダルトン未満である。

#### 【0272】

試験抽出物または化合物の厳密な供給源はアンタゴニストの同定に重要ではない。したがって、事実上任意の数の化学的抽出物または化合物からアンタゴニストを同定することができる。アンタゴニストになり得るそのような抽出物または化合物の例としては、これだけに限定されないが、植物に基づく抽出物、真菌に基づく抽出物、原核生物に基づく抽出物または動物に基づく抽出物、発酵ブロス、および合成化合物、ならびに既存の化合物の改変が挙げられる。これだけに限定されないが、糖類に基づく化合物、脂質に基づく化合物、ペプチドに基づく化合物、および核酸に基づく化合物を含めた任意の数の化学化合物のランダム合成または定方向合成（例えば、半合成または全合成）を生じさせるためにも多数の方法が利用可能である。合成化合物ライブラリーは、Brandon Associates (Merrimack, N.H.) およびAldrich Chemical (Milwaukee, Wis.) から市販されている。Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK)、Comgenex (Princeton, N.J.)、Brandon Associates (Merrimack, N.H.)、およびMicrosource (New Milford, Conn.) を含めたいくつもの会社から市販されている合成化合物ライブラリーからアゴニストおよびアンタゴニストを同定することができる。Aldrich (Milwaukee, Wis.) から入手可能なライブラリーなどの希少な化学的ライブラリーからCTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、およびPD-L2アンタゴニスト、または4-1BBアゴニストを同定することができる。Biotics (Sussex, UK)、Xenova (Slough, UK)、Harbor Branch Oceanographics Institute (Ft. Pierce, Fla.)、およびPharmaMar, U.S.A. (Cambridge, Mass.) を含めたいくつもの供給源から市販されている、細菌抽出物、真菌抽出物、植物抽出物および動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリーにおいて、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、およびPD-L2アンタゴニスト、または4-1BBアゴニストを同定することができる。天然および合成で作製したライブラリーおよび化合物を従来の化学的手段、物理的手段、および生化学的手段によって容易に改変する。

#### 【0273】

有用な化合物は多数の化学的クラス内に見いだすことができるが、一般には、有用な化合物は、小さな有機化合物を含めた有機化合物である。50ダルトンよりも大きい約2,500ダルトン未満、例えば、約750ダルトン未満または約350ダルトン未満の分子量を有する小さな有機化合物を本明細書に開示される方法において利用することができる。例示的なクラスとしては、複素環、ペプチド、糖類、ステロイドなどが挙げられる。化合物を、有効性、安定性、医薬適合性などが増強されるように改変することができる。いくつかの実施形態では、有用な化合物は、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に対して1nM未満、10nm未満、1μM未満、10μM未満、または1mM未満のKdを有する。

D. ペプチドバリエーション

#### 【0274】

ヒトCTLA-4、ヒトBTLA、ヒトTIM-3、ヒトLAG3、ヒトPD-1、ヒトPD-L1、またはヒトPD-L2に特異的に結合するイムノアドヘシン (immunoadhesin) も利用することができる。イムノアドヘシンは、免疫グロブリン分子のFc領域な

10

20

30

40

50

どの定常領域と融合したタンパク質の細胞外部分または結合性部分を含有する融合タンパク質である。PD-1に特異的に結合する免疫接着分子 (immunoadhesion molecule) の例は、どちらも参照により組み込まれるPCT公開WO2010/027827号およびWO2011/066342号に開示されている。これらの免疫接着分子としては、PD-L2-FC融合タンパク質であるAMP-224 (B7-DCIgとしても公知) が挙げられる。融合タンパク質である追加的なPD-1アンタゴニストは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2014/0227262号において開示されている。

【0275】

一実施形態では、開示されている方法において有用なLAG3アンタゴニストは、樹状細胞を活性化するために使用されている、可溶性LAG3であるIMP321である。別の実施形態では、開示されている方法において有用な (if use) TIM-3アンタゴニストは、CA-327 (Curis) である。

10

【0276】

CTLA-4アンタゴニストは、ドミナントネガティブタンパク質またはイムノアドヘンシであり得る。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2016/0264643号を参照されたい。追加的な抗CTLA-4アンタゴニストとしては、これだけに限定されないが、CTLA-4のその同類のリガンドに結合する能力を阻害し得る、B7のCTLA-4に結合する能力 (the ability of B7 to CTLA-4) を破壊し得る、CD80のCTLA-4に結合する能力を破壊し得る、CD86のCTLA-4に結合する能力を破壊し得る小分子を含めた任意の阻害剤が挙げられる。

20

【0277】

一実施形態では、アンタゴニストとして機能するCTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2タンパク質のバリエーションを、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2タンパク質の点変異体または切断変異体などの変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングして、アンタゴニスト活性を有するタンパク質を同定することによって同定することができる。一実施例では、アンタゴニストは、可溶性タンパク質である。

【0278】

さらなる実施形態では、アゴニストとして機能する4-1BBのバリエーションを、点変異体または切断変異体などの4-1BB変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングして、アゴニスト活性を有するタンパク質を同定することによって同定することができる。アゴニストは、可溶性タンパク質であり得る。

30

【0279】

したがって、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、または4-1BBバリエーションのライブラリーを核酸レベルでコンビナトリアル変異誘発によって生成することができ、これは変化に富んだ遺伝子ライブラリーによってコードされるものである。CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2または4-1BBバリエーションのライブラリーを、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的にライゲーションし、その結果、潜在的な配列の縮重セットを個々のポリペプチドとして、あるいは目的の配列のセットを含有するより大きな融合タンパク質のセットとして (例えば、ファージディスプレイのために) 発現できるようにすることによって作製することができる。

40

【0280】

縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なCTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2または4-1BBバリエーションのライブラリーを作製するために使用することができる種々の方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学合成を自動DNA合成機で実施し、次いで、合成された遺伝子を適切な発現ベクターにライゲーションすることができる。遺伝子の縮重セットの使用により、潜在的なCTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2または4-1BB

50

配列の所望のセットをコードする配列の全てを1つの混合物として提供することが可能になる。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は、当技術分野で公知である（例えば、Narang, et al., Tetrahedron 39:3, 1983; Itakura et al. Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984; Itakura et al. Science 198:1056, 1984を参照されたい）。

#### 【0281】

さらに、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2または4-1BBタンパク質コード配列の断片のライブラリーを使用して、指定のアンタゴニスト（または4-1BBの場合にはアゴニスト）のバリエーションのスクリーニングおよびその後の選択のための断片の集団を生成することができる。一実施形態では、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、または4-1BBコード配列の二本鎖PCR断片を、分子当たり約1回のみニックングが生じる条件下でヌクレアーゼを用いて処理し、二本鎖DNAを変性させ、DNAを再生させて異なるニック産物のセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成し、一本鎖部分を再形成された二重鎖からS1ヌクレアーゼを用いた処理により除去し、得られた断片ライブラリーを発現ベクターにライゲーションすることにより、コード配列断片のライブラリーを生成することができる。この方法により、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、または4-1BBの種々のサイズのN末端、C末端および内部の断片をコードする発現ライブラリーを得ることができる。

#### 【0282】

点変異または短縮によって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、およびcDNAライブラリーを選択された性質を有する遺伝子産物についてスクリーニングするための技法がいくつか当技術分野で公知である。そのような技法は、タンパク質のコンビナトリアル変異誘発によって生成された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適応できる。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするためのハイスループット分析に適用できる、最も広く使用されている技法は、一般には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、適切な細胞を得られたベクターのライブラリーで形質転換すること、および、コンビナトリアル遺伝子を、所望の活性の検出により、産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離が容易になる条件下で発現させることを含む。再帰的アンサンブル変異誘発（REM）をスクリーニングアッセイと組み合わせて使用して、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、もしくはPD-L2アンタゴニスト、または4-1BBアゴニストを同定することができる（Arkin and Youvan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815, 1992; Delagrave et al., Protein Eng. 6(3):327-331, 1993）。

#### 【0283】

一実施形態では、細胞に基づくアッセイを活用して、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2バリエーションのライブラリーを分析することができる。例えば、発現ベクターのライブラリーを、通常CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2を合成し、分泌する細胞株にトランスフェクトすることができる。次いで、トランスフェクトされた細胞を、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2および特定のCTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2（それぞれ）バリエーションが分泌されるように培養する。変異体の発現の、細胞または上清における活性に対する効果を、例えば、機能アッセイのいずれかによってなどで検出することができる。次いで、内因性活性が阻害された細胞からプラスミドDNAを回収し、個々のクローンをさらに特徴付けることができる。

#### 【0284】

ペプチド模倣体をCTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2アンタゴニストとして使用することもできる。ペプチド類似体は

、医薬品産業において、鋳型ペプチドと類似した性質を有する非ペプチド薬物として一般に使用される。これらの型の非ペプチド化合物は、通常、コンピュータ化された分子モデリングを利用して開発される。治療的に有用なペプチドと構造的に類似したペプチド模倣体を使用して、同等の治療効果または予防効果を生じさせることができる。一般に、ペプチド模倣体は、パラダイムポリペプチド（例えば、PD-1 生物学的活性を有するポリペプチド）と構造的に類似しているが、必要に応じて  $-CH_2NH-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ （シスおよびトランス）、 $-COCH_2-$ 、 $-CH(OH)CH_2-$ 、および  $-CH_2SO-$  連結で置き換えられる1つまたは複数のペプチド連結を有する。これらのペプチド連結は、当技術分野で公知の方法によって置き換えることができる（例えば、Morley, Trends Pharm. Sci. pp. 463-468, 1980; Hudson et al. Int. J. Pept. Prot. Res. 14:177-185, 1979; Spatola, Life Sci. 38:1243-1249, 1986; Holladay, et al. Tetrahedron Lett. 24:4401-4404, 1983を参照されたい）。ペプチド模倣体は、経済的に得ることができ、安定であり、かつ、半減期 (half-life) または吸収が増加し得る。ペプチド模倣体の標識は、通常、1つまたは複数の標識を、直接またはスパーサーを通じて（例えば、アミド基によって）、定量的構造-活性データおよび/または分子モデリングによって予測されるペプチド模倣体上の干渉されない位置（複数可）に共有結合により付着することを伴う。そのような干渉されない位置は、一般に、ペプチド模倣体が結合して治療効果を生じさせる巨大分子（複数可）との直接的な接触を形成しない位置である。ペプチド模倣体の誘導体化は、ペプチド模倣体の所望の生物学的または薬理活性に実質的に干渉しないものであるべきである。

#### 【0285】

CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG3、PD-1、PD-L1、またはPD-L2の生物学的活性に干渉するドミナントネガティブタンパク質をコードするドミナントネガティブタンパク質または核酸も本明細書に開示される方法において使用することができる。ドミナントネガティブタンパク質は、ドミナントネガティブタンパク質が対応する野生型タンパク質の少なくとも10アミノ酸、20アミノ酸、35アミノ酸、50アミノ酸、100アミノ酸、または150アミノ酸よりも多くに対して少なくとも50%、70%、80%、90%、95%、またはさらには99%の配列同一性を有する配列を有する任意のアミノ酸分子である。例えば、ドミナントネガティブPD-L1は、ネイティブな（野生型）PD-1よりも強くPD-1と結合するが、PD-1を通じたいかなる細胞シグナル伝達も活性化しない変異を有する。

#### 【0286】

ドミナントネガティブタンパク質は、発現ベクターとして投与することができる。発現ベクターは、非ウイルスベクターまたはウイルスベクター（例えば、レトロウイルス、組換えアデノ随伴ウイルス、または組換えアデノウイルスベクター）であり得る。あるいは、ドミナントネガティブタンパク質を組換えタンパク質として直接全身的にまたは感染領域に、例えば微量注射技法を使用して投与することができる。

#### 【0287】

ポリペプチドアンタゴニストは、原核生物または真核生物宿主細胞において、アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、しばしばより大きなポリペプチド（*ras*または酵素などとの融合タンパク質）の一部として発現させることによって産生させることができる。あるいは、そのようなペプチドを化学的方法によって合成することができる。組換え宿主における異種タンパク質の発現、ポリペプチドの化学合成、および *in vitro* における翻訳のための方法は当技術分野で周知である (Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), 2nd Ed., Cold Spring Harbor, N. Y.; Berger and Kimmel, Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Kaiser et al., Science 243:187, 1989; Merrifield, Science 232:342, 1986; Kent, Annu. Rev. Biochem. 57:957, 1988を参照されたい)。

## 【0288】

ペプチドは、例えば、直接化学合成によって作製することができ、アンタゴニストとして使用することができる。ペプチドは、N末端および/またはC末端に非ペプチド部分が共有結合性の連結によって結合した修飾ペプチドとして作製することができる。ある特定の好ましい実施形態では、カルボキシ末端もしくはアミノ末端のいずれか、またはその両方が化学修飾されている。最も一般的な末端アミノ基およびカルボキシル基の修飾は、それぞれアセチル化およびアミド化である。アシル化（例えば、アセチル化）またはアルキル化（例えば、メチル化）などのアミノ末端修飾およびアミド化などのカルボキシ末端修飾、ならびに環化を含めた他の末端修飾を種々の実施形態に組み入れることができる。コア配列に対するある特定のアミノ末端および/またはカルボキシ末端修飾および/またはペプチド伸長により、例えば、安定性の増強、効力および/または有効性の増加、血清プロテアーゼに対する抵抗性、望ましい薬物動態特性など、有利な物理的性質、化学的性質、生化学的性質、および薬理的性質をもたらすことができる。

10

## 【0289】

本開示を以下の非限定的な実施例によって例証する。

## 【実施例】

## 【0290】

(実施例1)

材料および方法

健康なドナーの血液試料ならびに患者の血液および組織試料：末梢血、関与しないリンパ節、転移性リンパ節および腫瘍試料を、HNSCCを有する個体、黒色腫を有する個体、結腸がんを有する個体、直腸がんを有する個体、肺がんを有する個体、結腸直腸肝転移を有する個体および卵巣がんを有する個体から得た。全ての対象が、施設のInstitutional Review Board (Providence Portland Medical Center, IRB)により承認された書面のインフォームドコンセントにサインした。

20

## 【0291】

試料採取時には、患者は治療を受けていなかった。以前には、患者は、化学療法、放射線療法、外科手術および免疫療法、または上記のいずれでもないものを含めた広範囲の治療を受けたことがあった。

30

## 【0292】

末梢血単核細胞を全血からFicoll-Plus (GE Healthcare) 勾配で精製し、分析前に凍結保存した。

## 【0293】

腫瘍検体を以下の通り調製した：簡単に述べると、滅菌条件下で、腫瘍を小片にカットし、0.5 mg/mlのヒアルロニダーゼ、1 mg/mlのコラゲナーゼ（どちらもSigma-Aldrich）、30 U/mlのDNase (Roche)ならびに最終濃度1.5%のヒト血清アルブミン (MP Biomedicals)を補充したRPMI-1640中で消化した。細胞を室温で1時間、磁気攪拌子で攪拌しながら消化した。細胞懸濁液を70 μmのフィルターを通して濾過した。腫瘍浸潤性リンパ球を上記の通りFicoll-Plus密度遠心分離によって富化した。腫瘍単細胞懸濁液を、さらに分析するまで凍結保存した。

40

## 【0294】

抗体およびフローサイトメトリー：蛍光標識抗体を以下の製造者から購入した：

Biolegend：CD3 (UCHT1)、CD4 (OKT-4またはRPA-T4)、CD8 (RPA-T8)、CD25 (BC96)、CD38 (HIT2)、CD45RA (HI100)、CD69 (FN50)、HLA-DR (L243)、CTLA-4 (BNI3)、4-1BB (4B4-1)、CCR7 (G043H7)、グランザイムB (GB11)、IFN-g (4S.B3)、TNF-a (Mab11)

BD Bioscience：CD27 (M-T271)、CD127 (HIL-7R

50

- M21)、PD-1 (EH12)、Ki-67 (B56)、  
 eBioscience: CD28 (CD28.2)、CD39 (eBioA1)、CD103 (Ber-ACT8およびB-Ly7)、FOXP3 (PCH101)、ICOS (ISA-3)  
 R&D: TIM-3 (344823)

【0295】

固定可能な生/死色素を使用して生存細胞 (Biolegend) を区別した。細胞表面染色をFACS緩衝液 (1% FBSおよび0.01% NaN<sub>3</sub>を補充したPBS) 中で実施した。細胞内染色をeBioscienceのFix/Permキットを使用し、製造者の指示に従って実施した。末梢血単核細胞およびTILによるサイトカイン産生をex vivoで分析するために、細胞をPMA (0.2 μM) およびイオノマイシン (1 μg/ml) で5時間刺激し、最後の2時間半はBFA (10 μg/ml) を存在させた。BD BioscienceのCytoFix/CytoPermキットを使用し、製造者の指示に従って細胞内サイトカイン染色を実施した。染色された細胞を細胞選別のために、LSRIIおよびFortessaフローサイトメーター、またはFACS Aria II (全てBD) で取得した。データをFlowJoソフトウェア (TreeStar) で解析した。

10

【0296】

細胞選別およびT細胞拡大: 凍結保存されたPBMCおよびTILを解凍し、Stem cellのT細胞富化キットを使用してTリンパ球を富化した。TIL富化のために、Epcamビーズ (StemCell) をカクテルに添加した。次いで、富化された画分を標識し、細胞選別後に目的の集団をFACS Aria II (BD) で99%純度まで精製した。

20

【0297】

TCR配列決定解析のために、細胞ペレットをさらに処理するまで凍結させた。

【0298】

DN CD8+TIL、SP CD8+TILおよびDP CD8+TILならびにPBMC由来のナイーブおよびメモリーCD8を増大させるために、T細胞を選別し、2mMのグルタミン、1% (vol/vol) 非必須アミノ酸、1% (vol/vol) ビルビン酸ナトリウム、ペニシリン (50 U/ml)、ストレプトマイシン (50 μg/ml) および10% ウシ胎仔血清 (Hyclone) を補充した完全なRPMI-1640中で培養した。T細胞 (細胞2000~5000個/ウェル) を、96ウェル丸底プレート (Corning/Costar) 中、照射した (4000 rad) 同種フィーダー細胞 (細胞2 × 10<sup>5</sup> 個/ウェル) および10 ng/mlのrh IL-15 (Biolegend) の存在下で1 μg/mlのPHA (Sigma) を用いてポリクローナル的に刺激した。1週間後、T細胞のクラスターが形成されたら、細胞を追加的な96ウェルプレート、IL-15を伴う完全培地中に分割し、これを2日後にまた繰り返し、その結果、4つの同一の反復をもたらした。次いで、12日目に4つの反復を24ウェルプレートのウェルにプールした。T細胞株を分析するまで維持した。

30

【0299】

マイクロアレイデータの取得: マイクロアレイ用の試料を、フロー分析と同様の方法で処理した。腫瘍消化を50ml円錐管において磁気攪拌子を用い、室温で1時間、0.3% ヒトアルブミン (MP Biomedicals 823051) および30 μg/mlのDNASE (Roche 04536282001) を有するRPMI (Life Technologies, 11875-093) 中1 mg/mlのコラゲナーゼ (Sigma, C-5138)、0.5 mg/mlのヒアルロニダーゼ (Sigma, H-6254) を用いて完了した。消化後、試料を70 μmのフィルターを通して濾過した。次いで、試料をRPMIで1:2に希釈し、フィコール (GE, 17-1440-02) 上に重ねて、遠心分離ステップによってリンパ球を富化した。富化された細胞をCD3、CD8、CD103、CD39について染色し、BD FACS Aria細胞選別機を使用して

40

50

選別した。選別された細胞を溶解させ、Direct-zol RNAミニプレップキット (zyo research) を使用してRNAを精製し、次いで、RNAをcDNAに逆転写し、増幅した。増幅されたcDNAをAffymetrix Prime-View 遺伝子チップ上にハイブリダイズさせた。

#### 【0300】

マイクロアレイデータ解析：Affymetrix Primeview 遺伝子発現アレイからAffymetrix GeneChip Command Console (AGCC) v. 3.1.1およびAffymetrix Expression Console v. 1.1ソフトウェアによって作成されたCHPファイルを、BRB ArrayTools、バージョン4.5.1 (インターネット、brb\_nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/で入手可能) ソフトウェアを使用してローディングし、それらの試料型 (すなわち、DN、SP、DP) でアノテートした。Affymetrix Quality Controlモジュールを実行して、発現結果が規格の範囲内であることを決定した (BioConductor R module: affy/affyQCReportを適用)。試料型間の差次的な発現を、Class Comparison/Between Groups of Arrays BRB Arrayモジュールを使用し、単変量検定の設定有意性閾値 (単変量検定のp値によって選別された最小二乗およびKolmogorov-Smirnov検定の報告) を使用して決定した。次いで、試料モジュールの図表/可視化を使用して、選択された遺伝子を使用した3群の多次元的解析をもたらした (BRB Array R モジュール: MDS.Rを適用)。

#### 【0301】

in-vitroにおけるT細胞活性化：ナイーブCD8 T細胞サブセットを磁気CD8 T細胞富化 (Stemcell) によって単離し、CD4、CD8、CD45RAおよびCCR7に対する抗体で標識し、選別した。ナイーブT細胞  $1 \times 10^5$  個を抗CD3/CD28 Dynabeads (Life Technologies) と共に、ビーズ：T細胞比1：2で、2 ng/mlのrh TGF-1 (R&D) の存在下または非存在下で培養した。24時間後に、実験の半分のためにビーズを磁気捕捉によって取り出した。1日目、2日目、3日目、4日目、7日目および9日目に活性化および分化マーカーの発現を評価した。

#### 【0302】

TCR VB 遺伝子のディープTCRシーケンシングおよびクローン性分析：選別されたT細胞集団のゲノムDNAに対して、TCR 遺伝子の可変V-JまたはV-D-J領域のディープシーケンシングを実施した。細胞  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  個の範囲にわたる循環CD8 T細胞サブセットおよび腫瘍常在CD8 T細胞サブセットからDNAを抽出した (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen)。TCR CDR3領域のシーケンシングおよびマッピングを行った (ImmunoSEQ, Adaptive Biotech)。試料当たりのカバレッジは  $> 10 \times$  であった。生産的再編成 (productive rearrangement) 由来のデータのみをさらなる解析のためにImmunoSEQ Analyzerプラットフォームから抽出した。異なるT細胞サブセットのクローン性を各サブセット内の500種の最も豊富なクローンのヌクレオチド配列比較によって評価した。

#### 【0303】

2つの所与の集団のTCR V 重複 (または類似性) を比較するために、本発明者らは、Morisitaの重複指数を使用した。Morisita-Horn類似性指数は、共通のクローン型の数およびクローン型サイズの分布の両方を説明するものであり、優性クローン型のクローンサイズに関して最も感度が高い (Venturi et al., J Immunol Meth, 2008参照)。

#### 【0304】

標的細胞認識の評価：4-1BBおよびCD25の上方調節ならびにIFN-分泌：4-1BBおよびCD25の上方調節ならびにIFN-の放出を、増やした自己CD8

T細胞による腫瘍細胞の認識を評価するための尺度として使用した。最初の増大の17~20日後に共培養実験を実施した。その前日に、増大させたT細胞を計数し、残りの4-1BBおよびCD25の発現を下方調節するために、IL-15を伴わない培地中で終夜、飢餓状態にした。次いで、増大させたCD8<sup>+</sup>T細胞( $1 \times 10^5$ )を単独でまたは腫瘍細胞(自己および同種、T細胞:標的細胞の比=10:1)と共に培養した。一部の条件では、腫瘍細胞を30 $\mu$ g/mlの抗MHCクラスI遮断抗体(BD Bioscience、クローンW6/32)と共に3時間プレインキュベートした後、T細胞を添加した。陽性対照として、Nunc MaxiSorpプレートを抗CD3抗体(OKT3)でコーティングし、T細胞を添加した。全ての条件について3連でプレイングした。24時間後、上清を収集し、サイトメトリックビーズアレイ(CBA)分析によって分析した。細胞を各条件についてプールし、生存能力色素で標識し、その後、CD39、CD103、CD25および4-1BB細胞表面染色を行った。細胞をフローサイトメトリーによって分析した。CBAに関しては、製造者のプロトコールに従った。具体的には、IFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ を分析した。

10

#### 【0305】

生標的細胞殺滅アッセイ: T細胞媒介性標的細胞殺滅アッセイを、37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>の細胞インキュベーターの内側に収容したIncucyte Zoom Systemで、製造者のプロトコール(Essen Bioscience)に基づいて実施した。自己腫瘍細胞のT細胞による殺滅を評価するために、5000~10000個の腫瘍細胞(自己腫瘍細胞株および同種腫瘍細胞株)を3連で96ウェル平底プレートへと播種し、10%集密度に到達した。増大させた自己T細胞サブセットを計数し、外因性IL-15を伴わずに終夜、飢餓状態にした。次いで、T細胞 $1 \times 10^5$ 個を自己腫瘍細胞および同種腫瘍細胞を伴って(T細胞:腫瘍細胞の比=10:1)または伴わずに培養した。一部の条件では、抗MHCクラスI抗体(BD Bioscience、クローンW6/32)を添加した。全ての条件で、NucView 488カスパーゼ3/7基質(Essen Bioscience)を添加して、活性なカスパーゼ3/7をモニタリングした。プレートを37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートし、1時間毎に3つの実験反復から4つの画像を10 $\times$ 対物レンズを使用して捕捉して、T細胞殺滅およびカスパーゼ3/7活性(緑色蛍光)を可視化した。緑色チャンネル取得時間は400ミリ秒であった。位相差に関して、小さなT細胞を排除するためにマスクを適用することによって細胞分割を実現した。エリアフィルターを適用して、1000 $\mu$ m<sup>2</sup>を下回る物体を排除した。20 $\mu$ mの半径および2緑色補正単位の閾値を用いたバックグラウンド不均一性補正のTop-Hat法により、緑色バックグラウンドノイズを差し引いた。実験にマスクを適用した後に蛍光シグナルを定量した。T細胞殺滅/アポトーシスの量を、提供されたZoomソフトウェア(Essen Bioscience)によって算出した。

20

30

#### 【0306】

統計解析: Prismソフトウェア(GraphPad、San Diego CA)を使用して統計的検定を実施した。図の説明文に記載の通り、チューキーの補正を伴う一元配置ANOVA分析によって有意性を決定した。

(実施例2)

40

結果

#### 【0307】

がん患者における抗腫瘍応答のレベルおよび品質を評価するため、ならびに免疫療法などの新しいがん処置戦略の作用様式を理解するために、腫瘍反応性CD8<sup>+</sup>T細胞の同定が重要である。最近、高悪性度の漿液性卵巣がん(HGSC)および非小細胞肺癌(NCLC)におけるCD103およびPD-1の共発現により、ヒト腫瘍反応性CD8<sup>+</sup>T細胞が同定された。それらの性質および機能をさらに定義するために、2種のヒト卵巣腫瘍から腫瘍浸潤性CD8<sup>+</sup>T細胞(TIL)をCD103陽性サブセットおよびCD103陰性サブセットへと選別し、それらの遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイによって決定した。この分析のために、フローサイトメトリーによって容易に検出することがで

50

きる、差次的に発現される細胞表面分子に焦点を当てた。判定基準を満たした、遺伝子アレイ比較において観察された最大の差異の1つは、CD39をコードし、細胞表面上に見いだされる遺伝子であるENTPD1であった(表1)。遺伝子アレイ結果を確認し、腫瘍浸潤性CD8<sup>+</sup>T細胞の多様性をよりよく理解するために、頭頸部扁平上皮細胞癌(HNSCC)患者から単離されたCD8<sup>+</sup>T細胞を染色し、CD103<sup>+</sup>集団に関してゲーティングした。CD39、ならびに活性化/疲弊ならびに発生の状態に関連付けられる追加的な細胞表面マーカーを調査した。全てのフローサイトメトリーマーカーの同時分析の複雑さから、マスサイトメトリーデータのために広範に使用されるt分布型確率的近傍埋め込み法(t-SNE)と称される方法が必要であった。興味深いことに、CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞におけるCD39の高発現がPD-1およびCD69の高発現レベルと重複した。逆に、CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞ではIL-7Rが低レベルで発現され(CD127)(図1Aおよび1B)、これにより、よりエフェクター様のT細胞表現型であることが示唆される。さらに、CD8<sup>+</sup>T細胞におけるCD103およびCD39の組合せ発現により、CD103<sup>-</sup>CD39<sup>-</sup>(ダブルネガティブ(DN)CD8)、CD103<sup>+</sup>CD39<sup>-</sup>(シングルポジティブ(SP)CD8)およびCD103<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>(ダブルポジティブ(DP)CD8)を含む3つの別個の細胞集団の同定がもたらされた。DP<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞はHNSCC、肺がん、黒色腫、卵巣がん、および直腸がんを含めたいくつかのヒト固形悪性病変において比較的高い頻度で検出されたが(図1C)、これらの細胞の頻度は黒色腫で最も高かった。対照的に、DP<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞は、HNSCC患者のサブセットならびに結腸がんを有する患者および結腸直腸肝転移(CRLM)を有する患者の大多数では非常に低い頻度で存在していた(図1Cおよび1D)。驚いたことに、結腸がん患者1名由来のTILは、DP<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞を非常に高い頻度で含有した。この患者は、高率の変異をもたらすミスマッチ修復遺伝子の変異によって引き起こされる稀な遺伝性障害であるリンチ症候群と診断された。興味深いことに、変異の頻度が高い腫瘍は、多数の新抗原を有する確率が高く、これらの患者は、無増悪生存期間が長期であることによって例示される通り、チェックポイント遮断免疫療法に対してより良好な転帰を有する(Le DT, N Engl J Med 2015; Snyder A, N Engl J Med 2014; Van Allen EM, Science 2015; Rizvi NA, Science 2015)。

#### 【0308】

次いで、DP<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞が、腫瘍細胞が存在する部位においてのみ見いだされるかどうかを調査した。これを扱うために、本発明者らが、原発腫瘍、転移性リンパ節(LN)、関与しないLNおよび末梢血を利用する権利を得た数名のHNSCC患者を分析した。図1eには、代表的な患者からの結果が示されており、CD8<sup>+</sup>T細胞によるCD39およびCD103の共発現は、原発腫瘍および転移性LNにおいて特に見いだされたが、末梢血および関与しないLNにおけるCD8<sup>+</sup>T細胞では存在しなかったかまたは非常に低い頻度で存在した。重要なことに、この発現プロファイルは、分析した大多数のHNSCC患者において確認された(図1F)。したがって、結果から、CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞におけるCD39発現により、腫瘍微小環境内で特異的に誘導されるCD8<sup>+</sup>T細胞の集団が同定されることが示される。

#### 【0309】

DN<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞、SP<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞およびDP<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の生物学をよりよく理解するために、3つの細胞集団を直接*ex vivo*において選別し、それらの全般的遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイによって決定した。この分析のために、T細胞を3件のHNSCCおよび2件の卵巣腫瘍から単離した。DP<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞とDN<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の比較により、これらの2つの細胞集団間で372種の差次的に発現される遺伝子が同定された。この選択された遺伝子一覧に対する主成分分析および教師なし階層クラスタリングから、DP<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞とDN<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞は別個のmRNAプロファイルを有するが、SP<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞は中間の遺伝子シグネチャーを示すことが明らかになった(図2aおよびb)。この選択された遺伝子のセットに対する実施した主成分分析および教師なし階層クラスタリングから、遺伝子発現プロファイルが

10

20

30

40

50

細胞型特異的であり、患者によって分離されるものではないことが明らかになった（図 2 A、2 B）。DP CD8 T細胞由来の転写物をDN CD8 T細胞に対して比較したところ、最大の増大のいくつかは、MKI67、TNFRSF9、CTLA-4、HAVCR2、およびGZMBなどの活性化/疲弊表現型に関連付けられた。対照的に、DP CD8 T細胞においてDN CD8 T細胞と比べて最も下方調節される遺伝子は、KLF2、CCR7、SELL、S1PR1、KLF2などの、T細胞再循環パターンに關与するものであった。この遺伝子発現プロファイルは、レジデントメモリーTシグネチャーを暗示する（図 2 C）。重要なことに、これらの活性化および再循環に関連するmRNAの発現プロファイルは、5種の腫瘍の全てにわたって一貫した（図 2 D）。したがって、DP CD8 T細胞は、腫瘍組織の外での再循環の喪失ももたらし得る、腫瘍における抗原により駆動される刺激および活性化を受けている細胞の遺伝子発現シグネチャーを示す。

10

### 【0310】

腫瘍浸潤性CD8 T細胞の特定の性質をさらに評価するために、分化および活性化マーカーの発現をフローサイトメトリーによってタンパク質レベルで分析した。DP CD8 T細胞は、SP CD8 T細胞またはDN CD8 T細胞と比較して高レベルのCD69を発現した（図 3 A）。CD69は、T細胞刺激後に上方調節され、スフィンゴシン1-リン酸受容体1（S1PR1）に媒介される組織からの放出をアンタゴナイズする活性化分子である（Mackay 2015; Skon 2013）。DP CD8 T細胞はまた、より低レベルのCCR7、IL7R（CD127）およびCD28も表し、これは、エフェクターメモリー表現型（ref）を示す。興味深いことに、DN CD8 T細胞およびSP CD8 T細胞がPD-1を発現したにもかかわらず、DP CD8 T細胞はこのタンパク質を有意に高いレベルで発現した（図 3 B）。さらに、CTLA-4、およびTIM-3は、DP CD8 T細胞集団内でほぼ排他的に発現された。したがって、DP CD8 T細胞は、特にDN CD8 T細胞およびSP CD8 T細胞と比較した場合に、高度に活性化されたエフェクターメモリー表現型を示した。さらに、DP CD8 T細胞集団内の4-1BBおよびKi-67の頻度の増大により、これらの細胞が腫瘍内で最近活性化され、増殖していることが示唆され、これにより、最近の同族抗原認識が示される。

20

### 【0311】

DN CD8 T細胞、SP CD8 T細胞およびDP CD8 T細胞のエフェクター機能を、それらのサイトカイン産生を単一細胞レベルで分析することによって直接ex vivoにおいて評価した。DP CD8 T細胞では、IFN- $\gamma$  およびまたはTNF- $\alpha$  を産生することができる細胞の頻度がDN CD8 T細胞およびSP CD8 T細胞と比較して低く、HNSCC患者6名において同様の結果が得られた（図 3 C、3 D）。対照的に、DP CD8 T細胞では、グランザイムB陽性細胞の頻度が有意に高いことによって実証された通り、細胞毒性ポテンシャルが増大した（図 3 E）。

30

### 【0312】

DP CD8 T細胞は腫瘍細胞が存在する部位においてのみ見いだされたことを考慮して、これらの細胞の発生をよりよく理解するために、この特定の表現型に關与する因子を同定した。TGF- $\beta$  によりT細胞におけるCD103の発現が駆動されることが確立される。TGF- $\beta$  は、腫瘍微小環境内で産生され、がん増悪において、上皮間葉転換を誘導し、それにより運動性および浸潤の増強をもたらすことによって主要な役割を果たす。慢性LCMV感染のマウスモデルにおいて、ならびに慢性HCVおよびHIV感染を有する患者（Gupta PK, PLOS Pathogen 2015）において、慢性的に刺激された/疲弊したCD8 T細胞でCD39発現が見いだされ、これにより、持続的TCR刺激のその発現における役割が裏付けられた。したがって、ナイーブCD8 T細胞において、TCR会合後に、TGF- $\beta$  の存在下または非存在下でCD103およびCD39上方調節のカイネティクスを分析した（図 4 および補足的なデータ）。CD39発現における持続的TCR刺激の役割に取り組むために、T細胞をCD3/CD28ビーズで9日間連続的に刺

40

50

激したか、または、ビーズを培養開始の24時間後に取り出した。培養3日以内にCD39発現が検出され、その発現が9日目までに増大した。T細胞をTGF- $\beta$ の存在下で刺激するとCD103が上方調節され、7日後には80%よりも多くの細胞が陽性であった。持続的TCR刺激の後にのみ、最適なCD103およびCD39上方調節が見いだされた。重要なことに、PD-1などの他の活性化マーカーの発現は細胞において急速に誘導されたので、持続的TCR刺激の非存在下でのCD39上方調節の欠如はT細胞活性化の限定に起因するものではなかった(図4)。CD103発現とは対照的に、TGF- $\beta$ は*in vitro*培養系においてCD39発現に影響を及ぼさなかった。したがって、持続的TCR刺激およびTGF- $\beta$ は、CD8<sup>+</sup>T細胞におけるCD103およびCD39の発現を促進するために必要な因子である。したがって、DP-CD8<sup>+</sup>T細胞は、TGF- $\beta$ リッチ環境における腫瘍内で慢性TCRシグナル伝達をもたらすそれらの同族抗原への繰り返し曝露でそれらの表現型を獲得するようである。

10

#### 【0313】

このデータから、DP-CD8<sup>+</sup>T細胞が腫瘍部位内のそれらの同族抗原を認識することが示唆された。これが正しい場合、優性TCRクローン型の選択的な拡大をもたらされ、その結果、他のCD8<sup>+</sup>T細胞集団と比較してクローン性が増加すると思われる。これを扱うために、DN-CD8<sup>+</sup>T細胞集団、SP-CD8<sup>+</sup>T細胞集団およびDP-CD8<sup>+</sup>T細胞集団内の、ならびに対になる血液および関与しないLN由来の総メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞のTCRクローン型を、TCRB遺伝子の高度に可変性のCDR3領域のシーケンシングを行うことによって評価した。DP-CD8<sup>+</sup>T細胞は、分析した他のCD8<sup>+</sup>T細胞集団のいずれと比較しても、よりオリゴクローナルであった(図5A)。各患者における最も頻度が高いクローン型30種は、それぞれHPV+HNSCC腫瘍、HPV-HNSCC腫瘍、および卵巣腫瘍において、DP-CD8<sup>+</sup>T細胞集団の56%、61%および66%を占めたが、DN-CD8<sup>+</sup>T細胞ではたった26%および23%および38%であり、メモリー末梢CD8<sup>+</sup>T細胞では20%未満であった。30種の最も増えたDP-CD8<sup>+</sup>T細胞クローン型は、DN-CD8<sup>+</sup>T細胞集団でははるかに頻度が低く、これらの3人の患者のDN-CD8<sup>+</sup>T細胞レパトリーの0.06%未満であった。興味深いことに、DP-CD8<sup>+</sup>T細胞と他の腫瘍浸潤性CD8<sup>+</sup>T細胞サブセットの間でTCRクローン型はほとんど共有されなかった(図5B)。対照的に、より大きな数のTCRクローン型がDN-CD8<sup>+</sup>T細胞とSP-CD8<sup>+</sup>T細胞の間で共有された。レジデントメモリーシグネチャーによって予測される通り(図2D)、DN-CD8<sup>+</sup>T細胞に存在する大多数のTCRクローン型も、腫瘍に関与しないLN内のメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞ならびに末梢血中のメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞と共有され(それぞれ $R^2 = 0.7710$ および $0.2022$ )、これにより、DN-CD8<sup>+</sup>T細胞が再循環することができ、それらの同族抗原を最終的に認識せずに腫瘍環境を潜在的に感知することが示唆された(図5C)。比較すると、DP-CD8<sup>+</sup>T細胞内に存在するクローン型が、関与しないLNまたは末梢血においてごくわずかに検出された。2つの集団間の重複を決定する、存在量に基づく類似性指数であるMorisita指数の算出により、本発明者らの結果がさらに裏付けられ、また、5つの患者試料にわたるこの所見の一貫性が示された(図5D)。集合的に、これらの結果から、DP-CD8<sup>+</sup>T細胞が腫瘍部位内でそれらの同族抗原に遭遇し、それにより、それらの活性化および腫瘍特異的T細胞クローンの局所的拡大をもたらされることが示唆される。

20

30

40

#### 【0314】

これが正しい場合、次には、DP-CD8<sup>+</sup>TILは、腫瘍反応性が富化されるはずである。したがって、4つの黒色腫瘍および2つのHNSCC腫瘍から自己腫瘍細胞株を生成し、DP-CD8<sup>+</sup>TILが腫瘍反応性および殺滅について富化されるかどうかを決定した。CD8<sup>+</sup>T細胞を、腫瘍消化物から直接CD103発現およびCD39発現に基づいて選別し、3つのCD8<sup>+</sup>T細胞集団を*in vitro*において増やした。増やした後、DN-CD8<sup>+</sup>TIL、SP-CD8<sup>+</sup>TILおよびDP-CD8<sup>+</sup>TILを4-1BB上方調節ならびにIFN- $\gamma$ 分泌によって評価される自己腫瘍細胞株に対する反応

50

性についてスクリーニングした。試験した6名の患者全員において、DP CD8 T細胞がDN CD8 TILおよびSP CD8 TILと比較して腫瘍反応性について高度に富化されることが見いだされた(図6A)。DP CD8細胞の間での腫瘍反応性CD8 TILの富化は、患者1について最も高い腫瘍とT細胞の比で反応性T細胞が87%に至ったことにより例示された。自己腫瘍の認識は、MHCクラスI遮断後または細胞を同種腫瘍細胞株と共に培養した場合にはDP TILサブセットにおける反応性は検出されなかったため、特異的であり、MHCクラスI拘束されたものであった(図6B)。腫瘍反応性DP CD8 T細胞が自己腫瘍細胞を死滅させることができるかどうかを扱うために、増大させたT細胞サブセットを自己腫瘍細胞と共培養し、腫瘍に特異的な殺滅についてIncucyte生細胞分析系を使用してモニタリングした。この系により、カスパーゼ3/7依存性アポトーシスを37においてリアルタイムで顕微鏡法によって可視化することが可能になる。4-1BB上方調節と一致して、漸増数のカスパーゼ3/7+事象によって例示される通り、DP CD8 T細胞のみが自己腫瘍細胞を死滅させた(図6C、6D)。この殺滅は、MHC-クラスI抗体W6/32によりこの効果が遮断されたため、MHC-クラスI依存的であった。対照的に、DN CD8 T細胞による自己腫瘍細胞殺滅はわずかに観察されたか全く観察されなかった。

10

20

30

40

#### 【0315】

最後に、DP CD8 TILの頻度と患者生存の関係を外科試料において評価した。この分析は、HNSCC患者の小さなコホート(n=62)に焦点を当てた。外科手術後、原発腫瘍内の総CD8 TILの間でのDP CD8 T細胞の頻度をフローサイトメトリーによって決定し、次いで、患者は標準治療処置(複数可)を受けた。患者をDP CD8 T細胞の頻度に基づいて、このコホートについてのDP CD8 T細胞の平均頻度と比べて高い群と低い群に分離した。この戦略を使用して、外科手術時に腫瘍のDP CD8 TILのパーセンテージが高い患者は全生存期間(OS)の延長と相関し(図6E)、これにより、HPV陰性サブグループにおける有意性がより大きいことが示されたことを見いだされた(図6F)。集合的に、CD103およびCD39の共発現により、腫瘍反応性CD8 TILおよびそれらの頻度が強力に富化され、HNSCC患者における全生存期間の延長と相関することが示された。

#### 【0316】

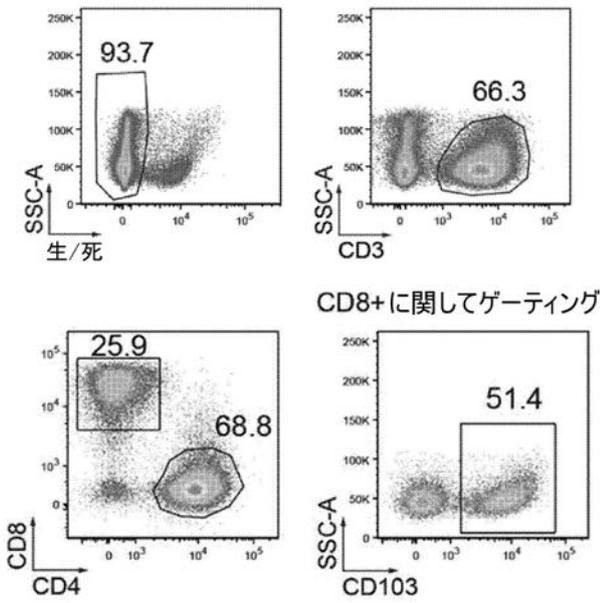
これらの結果に基づいて、DP CD8 TILにおいて高い頻度で存在するTCRクローン型が実際に腫瘍に特異的であるかどうかに取り組んだ。DP CD8 TILを自己腫瘍細胞と20時間にわたって共培養し、その後、4-1BB+CD25+CD8 T細胞を選別した。これらのT細胞を自己腫瘍株と共培養した場合に、ex-vivoにおいて高頻度で存在する大多数のクローン型がDP CD8 TILの4-1BB+CD25+画分内に見いだされ、これにより、これらが腫瘍反応性であることが実証された(図7A、7B)。データは、DP CD8集団由来のTCRを利用することが、養子移入の状況で治療的になることを意味する。注目すべきことに、2つの異なるHNSCC試料において、同じ患者内の原発腫瘍と転移性LNの間でDP CD8 TIL TCRレパートリーの強力な重複が観察された(図7C)。この結果は、転移性LNまたは原発腫瘍のいずれから同じDP CD8 TIL TCRを単離し、TCR治療に使用することができることを示唆するものであるため、重要である。

#### 【0317】

開示されている発明の原理を適用することができる多くの可能性のある実施形態を考慮して、例示されている実施形態は単に本発明の好ましい例であり、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではないことが認識されるべきである。そうではなく、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によって定義される。したがって、本発明者らは、これらの特許請求の範囲の範囲および主旨に入る全てが本発明者らの発明であると主張する。

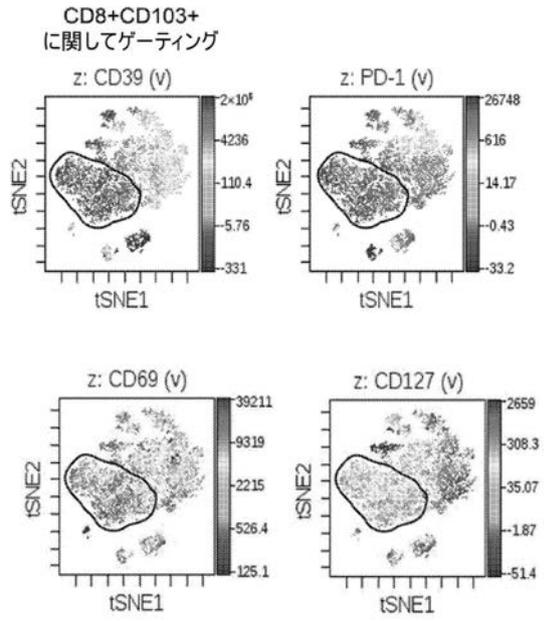
【 図 1 A 】

FIG. 1A



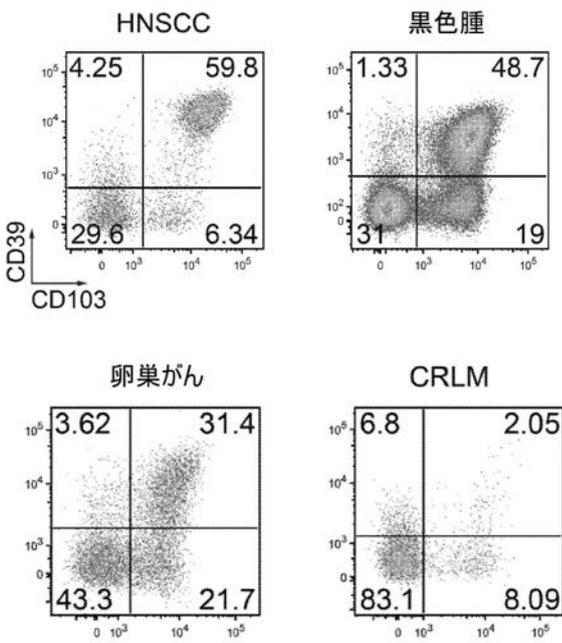
【 図 1 B 】

FIG. 1B



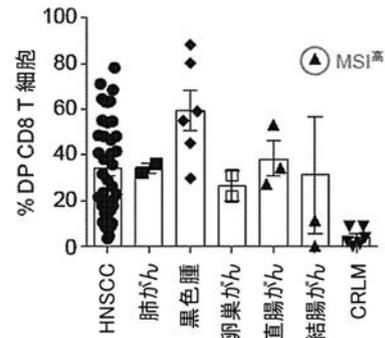
【 図 1 C 】

FIG. 1C



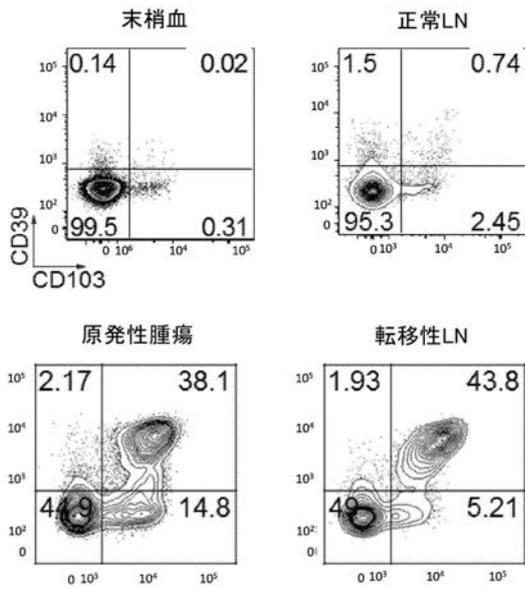
【 図 1 D 】

FIG. 1D

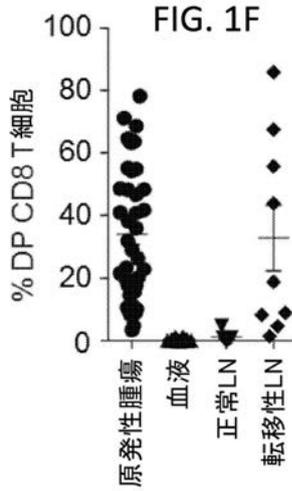


【 図 1 E 】

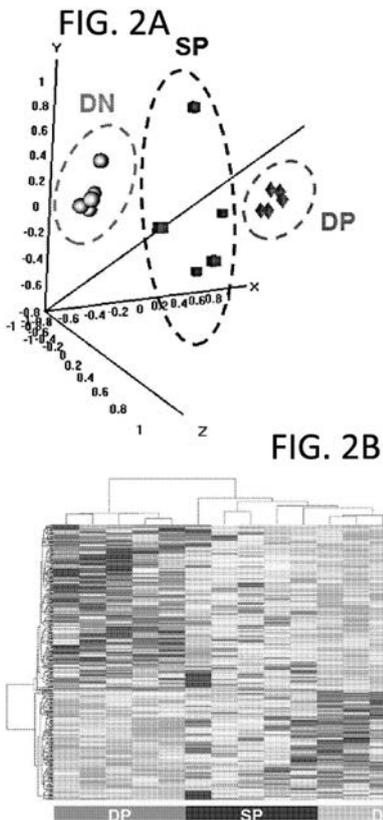
FIG. 1E



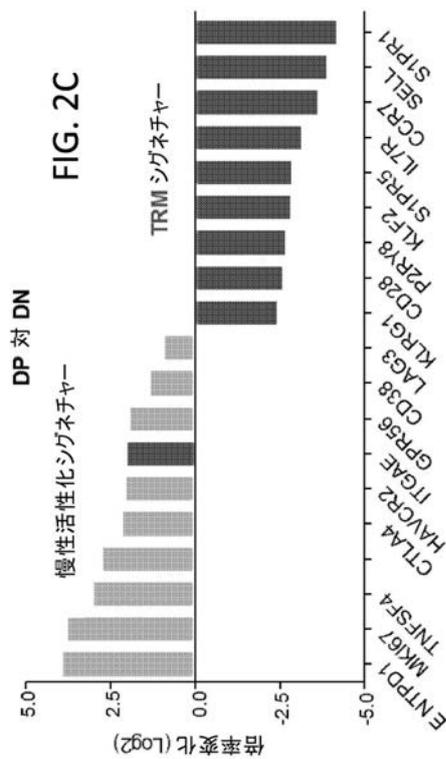
【 図 1 F 】



【 図 2 A B 】

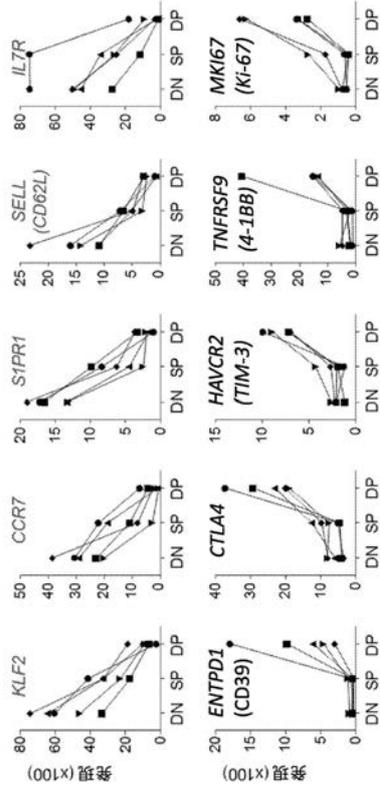


【 図 2 C 】



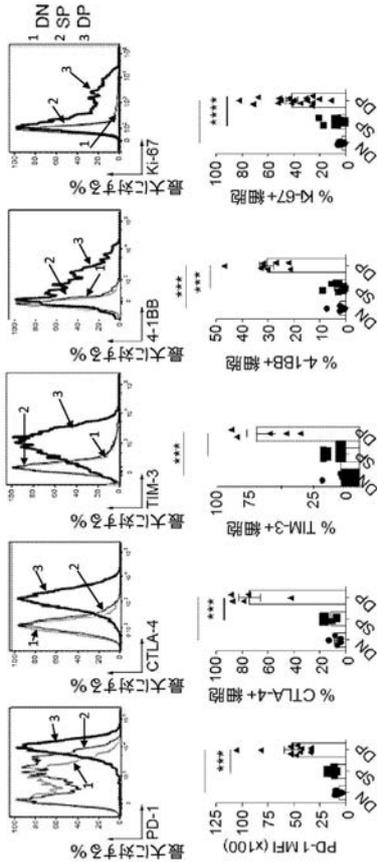
【 図 2 D 】

FIG. 2D



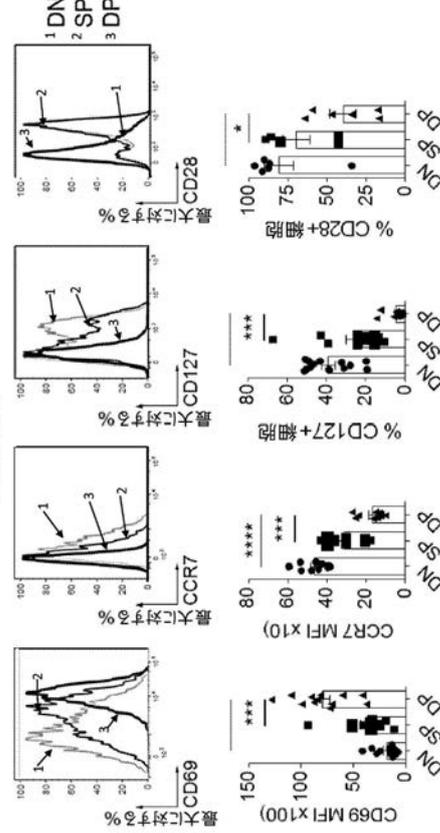
【 図 3 B 】

FIG. 3B



【 図 3 A 】

FIG. 3A



【 図 3 C D 】

FIG. 3C

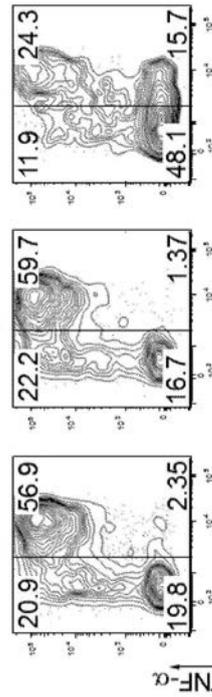
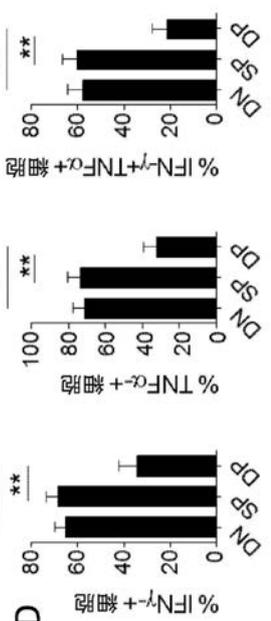
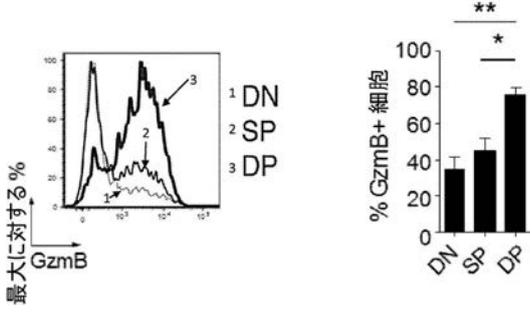


FIG. 3D



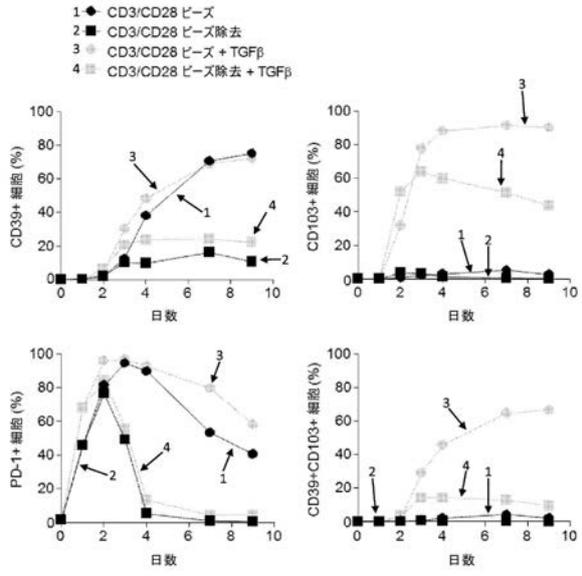
【 図 3 E 】

FIG. 3E

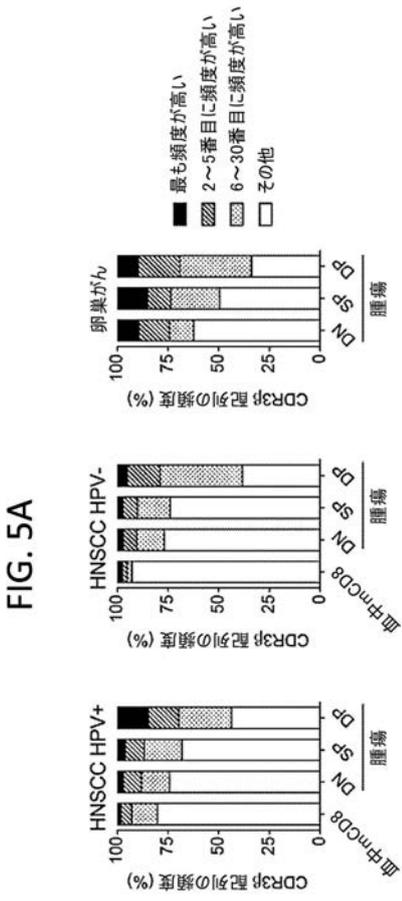


【 図 4 】

FIG. 4



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】

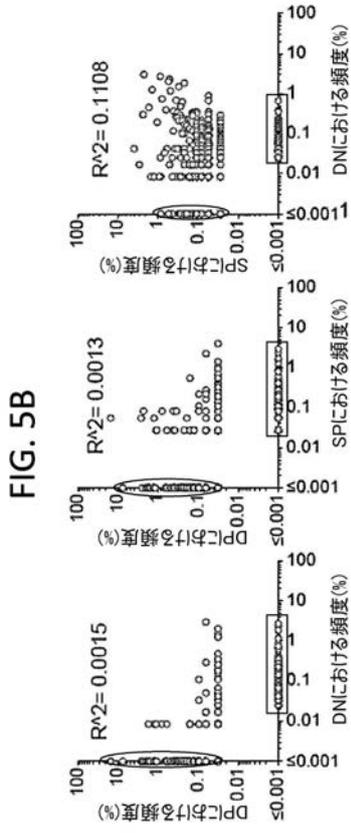
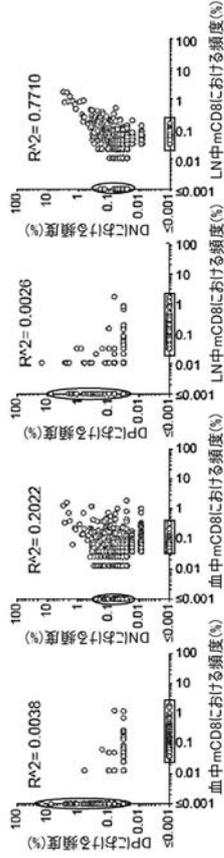


FIG. 5A

FIG. 5B

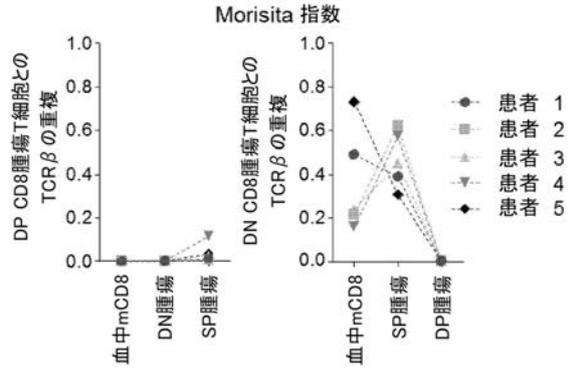
【 図 5 C 】

FIG. 5C



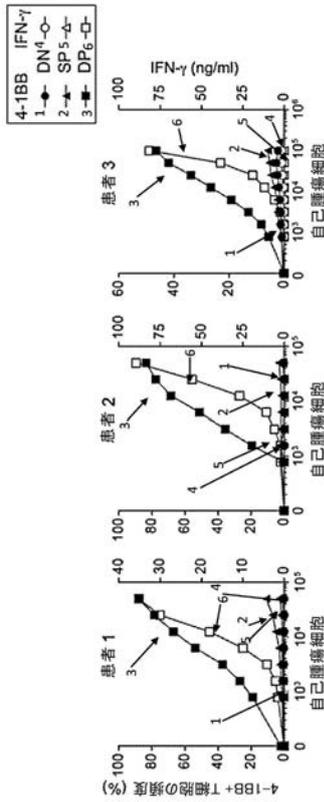
【 図 5 D 】

FIG. 5D



【 図 6 A 】

FIG. 6A



【 図 6 B C 】

FIG. 6B

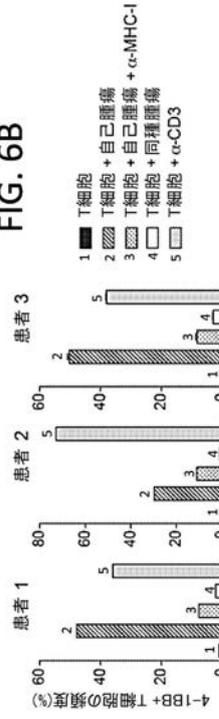
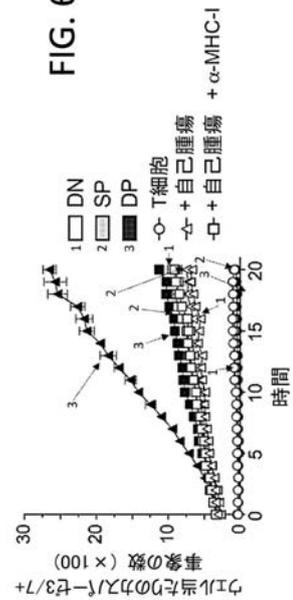
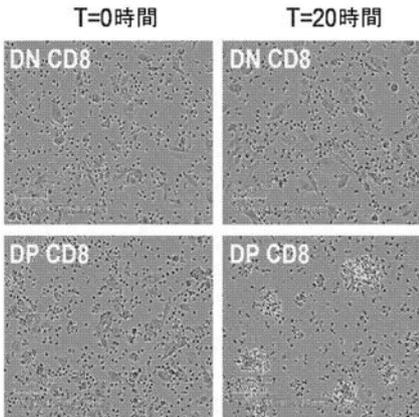


FIG. 6C



【 図 6 D 】

FIG. 6D



【 図 6 E F 】

FIG. 6F

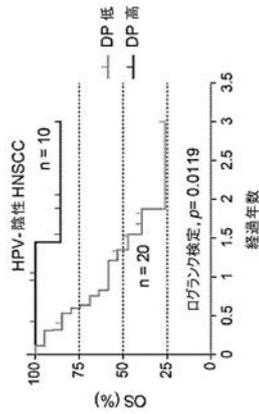
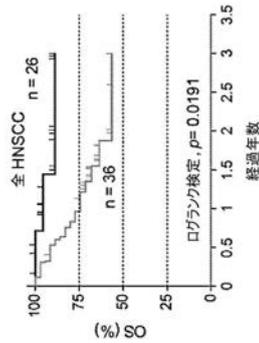


FIG. 6E



【 図 7 A 】

FIG. 7A

DP CD8 TILにおける頻度 (全クローン型に対する%)		TCRB CDR3領域 (ヌクレオチド配列)
共培養前	腫瘍反応性	
4.584	6.141	CCGCTCAGGCTGGAGTTGGCTGCTCCCTCC CAGACATCTGTACTTCTGTGCCAGCAGT TGGGTGGCGAGCAGTACTTCGGGCCG
3.776	0.340	CTGAGCTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCT TTGATTTCTGTGCCAGCAGCGGGACAGTT AACACCGGGGAGCTGTTTTTGGAGAA
3.190	0.783	GAGTCGCGCAGCACCAACACAGACATCTATG TACCTCTGTGCCAGCAGTTTCCGGGACAGG GGGCTTCAGCCCAAGCATTTTGGTAT
3.111	1.463	ACGATCCAGCGCACACAGCAGGAGACTC GGCCTGTATCTCTGTGCCAGCAGCTCGAC AAGGGCTACAGCAGTACTTCGGGCCG
2.932	4.316	CTGAGCTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCT TTGATTTCTGTGCCAGCAGCTTCGGACAG GGGGCTACGAGCAGTACTTCGGGCCG
2.697	0.095	CAGCGCAGAGCAGGGGGACTCGGCCAT GTATCTCTGTGCCAGCAGGACGAGACAGC CGGGAACACTGAAGCTTTCTTGGACAA
2.568	11.506	CTGGAGTCCGCGCAGCACCAACAGACATCT ATGTACCTCTGTGCCAGCAGTTTAGCTAGA AACACCGGGGAGCTGTTTTTGGAGAA
2.237	3.949	AAGATCCAGCCTGCAAGCTTGGAGACTCG GCCGTGTATCTCTGTGCCAGCAGCAGT AGTTCAGATACGAGTATTTGGCCCA
2.099	0.047	CAGCGCAGAGCAGCGGGACTCGGCCAT GTATCGCTGTGCCAGCAGCGAGGACCCG CGATCGATGAAAACCTGTTTTTGGCACT
2.025	0.905	GAGTCGCCAGGCCAAGCAGCTCTCTGTG TACTTCTGTGCCAGCAGTCTCGGGGATAT AGCAATCAGCCCAAGCATTTTGGTAT
1.939	1.388	ACTGTGACAGTGACCACTGCCATCTGAA GACAGCAGCTTCTACATCTGCAGCGCTTGG ACAGGCTACGAGCAGTACTTCGGGCCG
1.832	0.667	ATCCAGGCGCAGCAGCAGGAGGACTCGCC CGTGTATCTCTGTGCCAGCAGCAACTATTA ATGATCAATGAGCAGTCTTCGGGCCA
1.825	4.146	CGCACAGAGCAGGGGGACTCGGCCATGTA TCTCTGTGCCAGCAGTTATGGCCCCGGAC AGTTAATGAAAACCTGTTTTTGGCAGT
1.817	4.663	CTGGAGTCCGCTGCTCCCTCCAGACATCT GTGTACTTCTGTGCCAGCAGGCCCCITTT GGGCGAATGAGCAGTCTTCGGGCCA
1.651	1.280	ATCCAGCGCAGAGCAGGGGACTCGGC CATGTATCTCTGTGCCAGCAGCTCGATTCT CGGGGGGGAGCGCAGTATTTGGCCCA

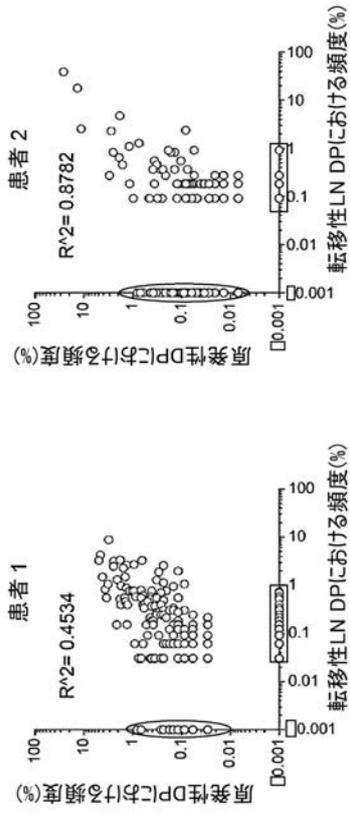
【 図 7 B 】

FIG. 7B

DP CD8 TILにおける頻度 (全クローン型に対する%)		TCRB CDR3領域 (ヌクレオチド配列)
共培養前	腫瘍反応性	
17.728	19.727	CGCACAGAGCAGGGGGACTCGGCCATGTA TCTCTGTGCCAGCAGCGCAGCTCAGGGGTC GGGTAAGGAGCCCAAGCATTTTGGTAT
6.919	16.125	TCTAAGAAGCTCCTTCTCAGTACTCTGGCT TCTATCTCTGTGCCAGCAGCTGTGGACTCC AGAACACTGAGCTTTCTTTGGACAA
5.381	2.651	CTGAGCTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCT TTGTATTTCTGTGCCAGCAGCAAGGATAT CCGTCAGAAAACTGTTTTTGGCAGT
4.772	9.584	AAGATCCGCTCCACAAGCTGGAGACTCA GCCATGTACTTCTGTGCCAGAAACAGGGT AAGGGAAAGAGCAGTCTTCGGGCCA
4.462	7.023	CCGCTCAGCCTGAGTTGGCTGCTCCCTCC CAGACATCTGTGCTACTTCTGTGCCAGCAGT TGGGTGGCGAGCAGTACTTCGGGCCG
3.537	0.050	ACTGTGACATCGGCCAAAGAAACCCGACA GCCTTTATCTGTGCCAGCAACCCAGGG TGGTACACTGAAGCTTTCTTGGACAA
3.518	0.021	ATCCAGCCCTCAGAACCCAGGACTCAGCT GTGTACTTCTGTGCCAGCAGCCCGGGG GTCTTACAATGAGCAGTCTTCGGGCCA
3.093	3.790	CAGCGCACAGCAGCGGGGACTCGGCCAT GTATCTGTGCCAGCAGCTCCCGGGTAG CTCTACAATGAGCAGTCTTCGGGCCA
3.010	1.553	ATCAATCCCTGGAGCTTGGTACTCTGTGT GTGATTTCTGTGCCAGCAGCTTTGACAG GGGGCTACAGCAGTACTTCGGGCCG
3.007	6.393	AAGAAGCTCCTTCTCAGTACTCTGGCTCT ATCTGTGCCCTTACTAGTCCGGACAAT ACGAGAGCCCAAGTACTTCGGGCCA
2.991	3.602	GAGTCGCCAGCCCAACAGCAGCTCTGTG TACTTCTGTGCCAGCAGCTTCGGGGATAT AGCAATCAGCCCAAGCATTTTGGTAT
2.499	0.093	ACTGTGACATCGGCCAAAGAAACCCGACA GCCTTTATCTGTGCCAGTATGAGGGT GGGGCACTGAAGCTTCTTGGACAA
2.398	0.058	CGCACAGAGCAGGGGGACTCGGCCATGTA TCTCTGTGCCAGCAGTTATGGCCCCGGAC AGTTAATGAAAACCTGTTTTTGGCAGT
2.368	0.114	GCCCAAAAGAACCCGAGCAGCTTCTATCTC TGTGCCAGTAGTCCCGCCGACAGGGGTC CGGGCAAGAGACCCAGTACTTCGGGCCA
2.208	7.404	CTAAACCTGAGCTCTCGAGCTGGGGGAC TCAGCTTTGTATTTCTGTGCCAGCAGCGGA CAGGGGGGAGCAGTACTTCGGGCCG

【 図 7 C 】

FIG. 7C



【 配列表 】

2020523018000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2018/031197
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC (2018.01) A61P 35/00, A61K 35/17, C12N 5/07, G01N 33/574, C12Q 1/688600 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC (2018.01) C12N, A61K, A61P, C12Q, G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Databases consulted: PATENTSCOPE, Esp@cenet, Google Patents, BIOSIS, PubMed, Google Scholar, PatBase, Derwent Innovation Search terms used: T cell receptor, TCR, "tumor cell antigen", CD39, CD103, CD8, T cells, tumor, solid, expand*, checkpoint inhibitor, allogeneic, autologous, IL-15, glutamine		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Rebekka Duhon, Thomas Duhon, Lucas Thompson, Ryan Montler, Andrew Weinberg; "P69 Identification of a novel subset of tumor-resident human CD8+ T cells, marked by dual expression of CD103 and CD39" 31st Annual Meeting and Associated Programs of the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC 2016): part one." Journal for immunotherapy of cancer. Vol. 4. No. 1. BioMed Central, 16.11.2016. ----- URL: <a href="https://jitc.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40425-016-0172-7">https://jitc.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40425-016-0172-7</a> Retrieved from the Internet on: 19.07.2018 16 Nov 2016 (2016/11/16) whole document	1-3,5-7
Y	whole document	4,8-38
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 Jul 2018		Date of mailing of the international search report 25 Jul 2018
Name and mailing address of the ISA: Israel Patent Office Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 9695101, Israel Facsimile No. 972-2-5651616		Authorized officer HERMAN Karin Telephone No. 972-2-5651749

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/031197

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>Djenidi, Fay?al, et al. "CD8+ CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients." <i>The Journal of Immunology</i> (27.02.2015): 1402711.</p> <p>URL: <a href="http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/early/2015/02/27/jimmunol.1402711.full.pdf">http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/early/2015/02/27/jimmunol.1402711.full.pdf</a> Retrieved from the Internet on: 19.07.2018</p> <p>27 Feb 2015 (2015/02/27) whole document</p>	11-20,26-38
Y	<p>Liu, Zhenjiang, et al. "Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) from patients with glioma." <i>Oncoimmunology</i> 6.2 (29.11.2016): e1252894.</p> <p>URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5353900/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5353900/</a> Retrieved from the Internet on: 19.07.2018</p> <p>29 Nov 2016 (2016/11/29) abstract, sections: Tumor cell generation, TIL expansion</p>	4,8-10,21-25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/031197

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a.  forming part of the international application as filed:  
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.  
 on paper or in the form of an image file.
- b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:  
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).  
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 1 2 Q 1/6837 (2018.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q 1/04	
	C 1 2 Q 1/6837	Z
	C 1 2 Q 1/6869	Z

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ワインバーグ, アンドリュー ディー.

アメリカ合衆国 オレゴン 9 7 2 1 3, ポートランド, エヌイー グリサン ストリート  
4 8 0 5

(72)発明者 モントラー, ライアン

アメリカ合衆国 オレゴン 9 7 2 1 3, ポートランド, エヌイー グリサン ストリート  
4 8 0 5, 2エヌ2 1

(72)発明者 ドゥヘン, トーマス

アメリカ合衆国 オレゴン 9 7 2 1 3, ポートランド, エヌイー グリサン ストリート  
4 8 0 5, 2エヌ1 7

(72)発明者 ドゥヘン, レベッカ

アメリカ合衆国 オレゴン 9 7 2 1 3, ポートランド, エヌイー グリサン ストリート  
4 8 0 5, 2エヌシー 2 9

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR55 QR84

QS10 QS14 QS24 QS28 QS34 QS39 QX02

4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA01 BB12 BB19 BB25 BB34 BB37

CA24 CA44

4C084	AA02	AA13	AA19	BA03	MA02	NA05	ZB091	ZB092	ZB212	ZB261
	ZB262	ZC412	ZC75							
4C085	AA13	AA14	BB11	CC22	CC23	EE03				
4C086	AA01	EA16	MA02	NA05	ZB09	ZB21	ZB26	ZC41	ZC75	
4C087	AA01	AA02	AA03	BB37	BB65	NA14	ZB09	ZB26	ZC75	
4H045	AA10	AA30	BA10	CA41	DA50	EA20	FA74			